MIKROCHIMICA ACTA

HERAUSGEGEBEN VON / EDITORIAL BOARD / PUBLIÉ PAR

A. A. BENEDETTI-PICHLER - New York · G. BLIX - Uppsala
C. DUVAL - Paris · F. FEIGL - Rio de Janeiro · J. HEYROVSKÝ - Praha
P. L. KIRK - Berkeley · H. LIEB - Graz · F. A. PANETH - Mainz
F. SCHNEIDER - New York · R. STREBINGER - Wien
C. L. WILSON - Belfast · M. K. ZACHERL - Wien

MITHERAUSGEBER / ASSISTANT EDITORS / RÉDACTEURS ADJOINTS

E. ABRAHAMCZIK - Ludwigshafen/Rhein · H. K. ALBER - Philadelphia
R. BELCHER - Birmingham · N. D. CHERONIS - New York
F. HECHT - Wien · W. KIRSTEN - Uppsala · A. LACOURT - Bruxelles
W. C. McCRONE - Chicago · A. L. THOMPSON - Montreal
PH. W. WEST - Baton Rouge · M. L. WILLARD - State College

SCHRIFTLEITUNG / EDITORIAL OFFICE / RÉDACTEUR EN CHEF

M. K. ZACHERL - Wien

1956

ERSTES BIS DRITTES HEFT

MIT 210 TEXTABBILDUNGEN UND 2 FARBIGEN ABBILDUNGEN AUF EINER TAFEL
ABGESCHLOSSEN AM 21. DEZEMBER 1955

MIKROCHEMIE-TAGUNG WIEN 1955
MICROCHEMICAL MEETING VIENNA 1955
JOURNÉES DE MICROCHIMIE À VIENNE 1955

12. BIS 17. JULI 1955

OFFIZIELLER BERICHT / OFFICIAL REPORT / RAPPORT OFFICIEL

IN ZWEI TEILEN

ERSTER TEIL

WIEN
SPRINGER-VERLAG
1956

Mikrochim. Acta

Die Zeitschrift

„Mikrochimica Acta"

erscheint zwanglos in Heften, die zu Jahresbänden von etwa 800 Seiten vereinigt werden. Der Preis eines Heftes richtet sich nach seinem Umfang und den jeweiligen Herstellungskosten.

Zur Veröffentlichung gelangen Originalarbeiten aus dem Gebiet der allgemeinen und angewandten Mikrochemie in deutscher, englischer und französischer Sprache, wenn sie nicht mehr als $1^1/_2$ Druckbogen umfassen. Die Reihenfolge der Veröffentlichung richtet sich im allgemeinen nach dem Datum des Eingangs der Manuskripte bei der Redaktion.

Für die Zeitschrift bestimmte Manuskripte aus USA. und Canada sind zu senden an:

Editors of „Mikrochimica Acta", Department of Chemistry, Queens College, Flushing, N. Y., USA. (Dr. A. A. Benedetti-Pichler and Dr. F. Schneider)

Sonstige Manuskripte in englischer Sprache sind zu senden an:

Dr. C. L. Wilson, Department of Chemistry, The Queen's University, Belfast

Manuskripte in französischer Sprache sind zu senden an:

Prof. Clément Duval, Laboratoire de Recherches micro-analytiques de l'E. N. S. C. P., 11, rue Pierre Curie, Paris, 5

Manuskripte in deutscher Sprache sind zu senden an:

Prof. Dr. M. K. Zacherl, Wien, I., Mölkerbastei 5

Geschäftliche Mitteilungen sind zu richten an:

Springer-Verlag, Wien, I., Mölkerbastei 5
Fernsprecher: U 26 5 60 Serie, Telegrammadresse: Springerbuch Wien

Grundsätzlich werden nur Arbeiten angenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

1956 **Inhaltsverzeichnis** 1. bis 3. Heft

Seite

Caspersson, T. Quantitative ultramikrospektrographische Verfahren ... 1

Götte, H. Anwendung der Radioaktivität in der analytischen Chemie 27

Lederer, M. Anorganische Papierchromatographie ... 43

Michl, H. Mikroelektrophorese ... 54

Hintenberger, H. Anwendung der Massenspektroskopie in der analytischen Chemie ... 71

Wilson, C. L. Ultramicroanalysis: Past, Present and Future ... 91

Lüdy-Tenger, F. Versuche über mikrochemische und mikrophysikalische Prüfungsmöglichkeiten an medizinisch wichtigen Pyridin-Derivaten 104

Simon, S. L'utilisation des méthodes microanalytiques dans l'analyse des spécialités pharmaceutiques ... 118

Otter, I. Methoden zur Rückstandsbestimmung von Insektiziden in pflanzlichem Material ... 125

Friedrich, W., Gisela Groß und K. Bernhauer. Zur chromatographischen Trennung der Vitamine der B_{12}-Gruppe. II ... 134

Brandstätter, Maria. Phasenkontrastmikroskopische Studien zum Kristallwachstum ... 154

Kratzl, K. Über den mikroanalytischen Nachweis des Lignins ... 159

Nietsch, B. Nachweis von Erdölprodukten in natürlichen Wässern durch Fluoreszenz ... 171

Barlot, J. Détermination microchimique de l'indium ... 179

Blohm, S. G., and G. Widmark. Investigation of Monoterpenes by Micro Displacement Adsorption ... 184

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

MIKROCHIMICA ACTA

HERAUSGEGEBEN VON / EDITORIAL BOARD / PUBLIÉ PAR

A. A. BENEDETTI-PICHLER - New York · G. BLIX - Uppsala
C. DUVAL - Paris · F. FEIGL - Rio de Janeiro · J. HEYROVSKÝ - Praha
P. L. KIRK - Berkeley · H. LIEB - Graz · F. A. PANETH - Mainz
F. SCHNEIDER - New York · R. STREBINGER - Wien
C. L. WILSON - Belfast · M. K. ZACHERL - Wien

MITHERAUSGEBER / ASSISTANT EDITORS / RÉDACTEURS ADJOINTS

E. ABRAHAMCZIK - Ludwigshafen/Rhein · H. K. ALBER - Philadelphia
R. BELCHER - Birmingham · N. D. CHERONIS - New York
F. HECHT - Wien · W. KIRSTEN - Uppsala · A. LACOURT - Bruxelles
W. C. McCRONE - Chicago · A. L. THOMPSON - Montreal
PH. W. WEST - Baton Rouge · M. L. WILLARD - State College

SCHRIFTLEITUNG / EDITORIAL OFFICE / RÉDACTEUR EN CHEF

M. K. ZACHERL - Wien

1956

MIT 560 TEXTABBILDUNGEN
UND 2 FARBIGEN ABBILDUNGEN AUF EINER TAFEL

WIEN
SPRINGER-VERLAG
1956

Inhaltsverzeichnis

Erstes bis drittes Heft

(Abgeschlossen am 21. Dezember 1955)

Offizieller Bericht über die
Mikrochemie-Tagung Wien 1955, 12. bis 17. Juli 1955

Seite

Caspersson, T. Quantitative ultramikrospektrographische Verfahren ... 1

Götte, H. Anwendung der Radioaktivität in der analytischen Chemie 27

Lederer, M. Anorganische Papierchromatographie 43

Michl, H. Mikroelektrophorese 54

Hintenberger, H. Anwendung der Massenspektroskopie in der analytischen Chemie 71

Wilson, C. L. Ultramicroanalysis: Past, Present and Future 91

Lüdy-Tenger, F. Versuche über mikrochemische und mikrophysikalische Prüfungsmöglichkeiten an medizinisch wichtigen Pyridin-Derivaten 104

Simon, S. L'utilisation des méthodes microanalytiques dans l'analyse des spécialités pharmaceutiques 118

Otter, I. Methoden zur Rückstandsbestimmung von Insektiziden in pflanzlichem Material 125

Friedrich, W., Gisela Groß und K. Bernhauer. Zur chromatographischen Trennung der Vitamine der B_{12}-Gruppe. II 134

Brandstätter, Maria. Phasenkontrastmikroskopische Studien zum Kristallwachstum 154

Kratzl, K. Über den mikroanalytischen Nachweis des Lignins 159

Nietsch, B. Nachweis von Erdölprodukten in natürlichen Wässern durch Fluoreszenz 171

Barlot, J. Détermination microchimique de l'indium 179

Blohm, S. G., and G. Widmark. Investigation of Monoterpenes by Micro Displacement Adsorption 184

Ma, T. S., and R. F. Sweeney. Microchemistry for the Organic Chemist: A Postgraduate Training Program 191

Cheronis, N. D. The Use of Microtechniques in the Teaching of Chemistry 202

Vagnina, L. L. The Application of Microchemistry in Forensic Chemistry 221

Mayer †, F. X. Anwendung mikrochemischer Methoden in der Kriminalistik 226

Seite

Keler-Bačoka, Mira. Der Sublimattest als Mikromethode zur Bestimmung der γ-Globuline im Serum 237

Cavicchi Sandri, Gilda. Sul riconoscimento microchimica della β-fenil isopropilamina 244

Anastasi, Ada, U. Gallo ed **E. Mecarelli.** Determinazione di alcuni composti ossiantrachinonici a mezzo di titolazione in solventi non acquosi 252

Tänni, H. Die mikrochemische Jodbestimmung in Milch und Milchprodukten 257

Saró Graf, J. C. Sobre un nuevo complejo microquímico y su applicación a la investigación del Cu^{++} 263

Hamm, R. Über die Bestimmung von Calcium, Magnesium, Zink und Eisen in tierischem Gewebe 268

Spitzy, H., und **H. Lieb.** Zur Methodik der Blutjodbestimmung 273

Ruždić, I., und **Kata Blažević.** Die spektrometrische Bestimmung des Kupfers im Serum 288

Addink, N. W. H. Bestimmung von Spurenelementen (ohne chemische Vorbehandlung) und Analyse kleinster Materialmengen mittels spektrochemischer Methoden 299

de Laffolie, H. Über die Nachweisgrenze in der Spektralanalyse 304

Holdt, G. Zur Genauigkeit der Glimmschichtmethode (cathode arc layer) 311

Pfeilsticker, K. Eine spektrochemische Mikrobestimmung des Bleis in biologischem Material 319

López de Azcona, J. M. Valoración espectrográfica de rubidio y estroncio en las micas 334

Seith †, W., und **W. Gremm.** Spektralanalytischer Spurennachweis nach Anreicherung durch innere Elektrolyse 339

Rost, F. Zur Spektralanalyse von Siliciumcarbid 343

Fischer, J., und **A. Doiwa.** Zum Problem der Partner bei der Flammenspektrometrie 353

Burriel-Martí, F., J. Ramírez-Muñoz et **M. C. Asunción-Omarrementería.** Applications de la photométrie de flamme à l'analyse des éléments différents aux alcalins et alcalino-terreux 362

Preuss, E. Zur Spektralanalyse kleiner Substanzmengen 382

Schüller, H. Über die Bestimmung der Spurenelemente in der Agrikulturchemie 393

Maucher, A., und **S. Auerhammer.** Spektralanalytische Bestimmung kleiner Einschlüsse in Gesteinen mittels Hochfrequenzanregung 401

Hansen, G. Spektrophotometrische Messung an kleinsten Flüssigkeitsmengen 406

Pohl, F. A. Mikromethoden in der Halbleiterforschung 414

Mitchell Jr., J., and **Ada L. Ryland.** Identification of Organic Compounds by Microscopy and X-Ray Diffractometry 422

Beynon, J. H. The Use of the Mass Spectrometer for the Identification of Organic Compounds 437

Seite

Duval, C., et **J. Lecomte.** Interprétation des spectres d'absorption infrarouges de phosphites et d'hypophosphites métalliques 454

Duval, C., et **Tran Ba Loc.** Premières applications du thiocarbohydrazide en chimie minérale 458

Sternberg, J. An Automatic Device for Quantitative Estimate of Paper Electrophoresis and Radioelectrophoresis 462

Malissa, H. Beiträge zur Mikromethodik in der Eisenforschung 474

Mayer †, F. X., und **P. Schweda.** Studien zur quantitativen Bestimmung von Mikrogrammengen Blei 485

Rasin-Streden, R., W. Dauschan und **O. Zemek.** Eine photometrische Bestimmung des Samariums in Ceriterdengemischen 512

Nielsch, W., und **Lieselotte Giefer.** Photometrische Nickelbestimmung mit Natriumdimethylglyoxim 522

Oosting, M. Eine neue selektive und empfindliche Wismutbestimmung 528

Pavelka, F., und **R. Pieruccini.** Untersuchungen über die Aluminium-Sperrschicht 535

Ferrari, C. Neue Ergebnisse zur Mikrobestimmung der Phosphorsäure und ihre Anwendung zur Bestimmung der leichtest löslichen Phosphate in Böden 551

Benedetti-Pichler, A. A. Bei Präzisionswägungen zu beachtende Vorsichtsmaßregeln 565

Viertes bis sechstes Heft

(Abgeschlossen am 21. Dezember 1955)

Offizieller Bericht über die
Mikrochemie-Tagung Wien 1955, 12. bis 17. Juli 1955

Gysel, H. Unbewußte und bewußte Schätzungsanomalien beim Wägen und ihre Auswirkungen auf die Genauigkeit von Mikroanalysen 577

Hodsman, G. F. Microchemical Balance Design 591

Asbury, H., R. Belcher, and **T. S. West.** A Simple Robust Ultramicrobalance 598

Bishop, E. Ultramicro Potentiometric Titrimetric Analysis 619

Scheid, H. Die Preglsche Präzisionswägepipette und ihre Verwendung in der Medizin 630

Gabler, F. Ein Beitrag zur Fernsehmikroskopie 638

Svensson, G. Bestimmung von Absorption und Brechungsindex extrem hochabsorbierender Lösungen im Mikromaßstab 645

Abrahamczik, E. Ionenaustausch in der Mikroanalyse und bei präparativen Mikroarbeiten 651

Schleicher, A. Neue Verbesserungen der qualitativen Schnellanalyse 663

Weisz, H. Die Ringofenmethode 667

Kakihana, H. Microchemical Detection of Several Elements Using Ion-Exchange Resin 682

Seite

Bruninx, E., J. Eeckhout et **J. Gillis.** Séparation du niobium et du tantale par chromatographie sur papier 689

Lacourt, A. La chromatographie quantitative sur papier, technique typiquement microchimique 700

Ballczo, H., und **G. Doppler.** Die mikromaßanalytische Bariumsulfatbestimmung 734

Duval, C. Premières applications des spectres d'absorption infrarouges réalisés sur une goutte de solution aqueuse 741

Duval, C., et **N. Dat Xuong.** Emploi des thiocarbohydrazones en analyse organique fonctionelle 747

Servigne, Yvette. Etudes micro-analytiques des ions oxyhalogénés par chromatographie et absorption infrarouge 750

Gillis, J., J. Van Der Stock et **J. Hoste.** Dosage microgravimétrique et spectrophotométrique du calcium par la lorétine 760

Flaschka, H., und **H. Abdine.** Mikrotitrationen mit Äthylendiamintetraessigsäure. XV 770

Flaschka, H., und **E. Laßner.** Über die kolorimetrische Bestimmung von Niob mit Tiron 778

Flaschka, H. Extraktionsanalytische Verwendung des nicht sulfonierten Eriochromschwarz T 784

Kosta, L., and **J. Hoste.** The Separation of Micro-Amounts of Indium from Zinc by Liquid-Liquid Extraction 790

Hoste, J., and **H. van den Berghe.** Determination of Micro-Amounts of Indium in Zinc and in Gallium by Radioactivation 797

Vioque, A., y **Mª del Pilar Villagrán.** Elementos trazas en grasas comestibles. II 804

Berisso, B. Sobre una nueva reacción microquímica que sirve para caracterizar y diferenciar mediante tecnicas microanalíticas adecuadas mercurio, iridio, indio, platino y oro 812

Unterzaucher, J. Über kristallisierte Anhydrojodsäure als Oxydationsmittel bei der direkten Mikrosauerstoffbestimmung in organischen Substanzen 822

Kirsten, W. J. Ultramikromethoden in der quantitativen organischen Elementaranalyse 836

Kainz, G., und **F. Schöller.** Mikrobestimmung des Fluors in organischen Substanzen 843

Kainz, G., A. Resch und **F. Schöller.** Über die Verwendung von Kupfer bei der Mikro-C-H-Bestimmung 850

Rush, C. A., St. S. Cruikshank, and **Erna J. H. Rhodes.** Microanalysis of Perfluoro Compounds 858

Schöniger, W. Beitrag zur mikroanalytischen Sauerstoffbestimmung nach Unterzaucher 863

Schöniger, W. Die mikroanalytische Schnellbestimmung von Halogenen und Schwefel in organischen Verbindungen 869

Ingram, G. Some Further Deliberations on the Rapid Combustion Procedure 877

Seite

Belcher, R., and **A. M. G. Macdonald.** The Microanalysis of Fluorine-Containing Organic Compounds. IV ... 899

Lévy, R. Microdosage des halogènes dans les composés organiques 906

Cheronis, N. D. Recent Advances in the Application of Micromethods to the Identification of Organic Compounds ... 925

Luis, P., y **J. B. Niederl.** Reconocimiento de nicotina en una hebrita de tabaco ... 948

Reichl, E. R. Papierchromatographische Strukturanalyse ... 955

Clark, S. J., and **D. J. Morgan.** The Spectrophotometric Determination of Secondary Aliphatic Amines ... 966

Beck, G. Die differenzierte, zeitliche Titration von Proteinen mit n/150 Kaliumcupri-3-tellurat ... 977

Forster, E. L., und **J. W. Breitenbach.** Osmotische Messungen mit Mikromengen hochpolymerer Stoffe ... 982

Pirsch, J. Beitrag zur Frage der Gitterkräfte organischer Moleküle ... 992

Schulek, E., E. Pungor und **J. Trompler.** Neue Wege in der Gasanalyse 1005

Peters, K. Über die Anwendung des Gegenstromprinzips in der Mikrogasanalyse ... 1023

Stratmann, H. Mikroanalytische Bestimmung verschiedener Schwefelverbindungen in Gasen und in festen Stoffen ... 1031

Janák, J. Systematische chromatographische Mikroanalyse der Gase 1038

Schönfeld, T. Beiträge der Radiochemie zur Theorie der chemischen Analyse ... 1050

Sverak, L. Eine einfache und empfindliche Methode zur Bestimmung von Radiokohlenstoff (^{14}C) ... 1068

Wenger, P. E., et **D. Monnier.** Méthodes de séparations microchimiques quantitatives ... 1075

Derkosch, J., und **M. Weiser.** Die Ausstellung mikrochemischer Geräte im Rahmen der Mikrochemie-Tagung 1955 ... 1096

Buchbesprechung ... 1103

Siebentes und achtes Heft

(Abgeschlossen am 7. Februar 1956)

Dangl, F. Bemerkungen zur Lumineszenzmikroskopie ... 1105

Belcher, R., and **A. M. G. Macdonald.** The Microanalysis of Fluorine-Containing Organic Compounds. V ... 1111

Schulek, E., und **E. Pungor.** Über das Mangan(II)carbonat und einige seiner gasanalytisch wertvollen Eigenschaften ... 1116

Schulek, E., und **E. Pungor.** Neue Wege in der Gasanalyse. II ... 1120

Suter, H. A., and **Patricia H. Suter.** A Selective Spot Test for Nitrate Ion 1136

Shah, G. D., V. S. Pansare, and **V. N. Mulay.** A Modified Micro-Dumas Method for Rapid Determination of Nitrogen ... 1140

Seite

Sunner, S., K. J. Karrman, and **V. Sundén.** Separation of Mercaptans by Gas-Liquid Partition Chromatography 1144

Ziegler, M., und **O. Glemser.** Über den Nachweis von Palladium mit Violursäure 1152

Sykes, A. The Determination of Metals in Organic Compounds 1155

Neu, R. Mikrogrammnachweis von 3-Hydroxyflavonen mit aromatischen Diarylborsäuren. VI. 1169

Brandstätter, M., und **H. Grimm.** Beitrag zur Polymorphie organischer Verbindungen 1175

Belcher, R., and **M. K. Bhatty.** The Elimination of the Distillation Procedure in the Kjeldahl Method 1183

Belcher, R., and **A. M. G. Macdonald.** The Microanalysis of Fluorine-Containing Organic Compounds. VI. 1187

Kolšek, J. Beitrag zur mikroskopischen Untersuchung und Identifizierung der Mutterkornalkaloide 1193

Lacourt, A., and **P. Heyndryckx.** Paper Chromatography Leads to Improved Reproducibility of Results 1211

Holasek, A., H. Lieb und **W. Merz.** Zur mikroanalytischen Bestimmung von Cystin und Methionin 1216

Ladenbauer, Inge-Maria, und **O. Slama.** Fluorometrische Mikrobestimmung des Galliums mit Dibromoxin 1219

Weisz, H. Zum Nachweis von Chlorid, Bromid, Jodid und Thiocyanat 1225

Korkisch, J., und **F. Hecht.** Trennung des Galliums von dreiwertigem Eisen mittels Ionenaustausches 1230

Slama, O., und **Inge-Maria Ladenbauer.** Papierchromatographische Trennung des Galliums von Eisen, Titan und Aluminium und seine fluorometrische Bestimmung mit 5,7-Dibrom-8-hydroxychinolin 1238

Pungor, E., A. J. Hegedüs, I. Konkoly Thege und **E. É. Zapp.** Über die Rolle der Flammentemperatur bei der flammenphotometrischen Analyse der Alkalimetalle 1247

Gorbach, G., und **H. Demmel.** Beiträge zur quantitativen „Test Tube"-Papierchromatographie 1264

Struck, H. Papierchromatographische Trennung von Aldehyden mittels ihrer Reaktion mit Benzsulfhydroxamsäure 1277

Hecht, F., J. Korkisch, R. Patzak und **A. Thiard.** Zur Bestimmung kleinster Uranmengen in Gesteinen und natürlichen Wässern 1283

Feigl, F., and **A. Caldas.** Some Applications of Fusion Reactions with Zinc Chloride in Inorganic Spot Test Analysis 1310

Feigl, F., und **D. Goldstein.** Nachweis von Kohlenstoff in der Tüpfelanalyse 1317

Mitteilungen aus chemischen Gesellschaften 1322

Buchbesprechungen 1330

Neuntes Heft

(Abgeschlossen am 14. April 1956)

Seite

Ayers, Cora W. Some Applications of the Use of the Reflectance Photodensitometer to Spot Test Analysis 1333

Burton, J. D., and **J. P. Riley.** Determination of Soluble Phosphate, and Total Phosphorus in Sea-Water and of Total Phosphorus in Marine Muds 1350

Blackman, L. C. F. Separation and Identification of Molybdenum and Tungsten 1366

Schöniger, W., und **A. Haack.** Ein bewährtes Destillationsgerät für die mikroanalytische Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 1369

Owen, W. S., and **W. M. Reid.** Apparatus for the Determination of Melting Points and Boiling Points 1373

Kolšek, J. Beitrag zur papierchromatographischen Bestimmung der Mutterkornalkaloide 1377

Lacourt, A., et **P. Heyndryckx.** Mise au point du microdosage spectrophotométrique direct du cobalt sur papier 1389

Dupuis, Thérèse. Etude des réactions de l'acétylformazyle et de ses dérivés avec les ions minéraux 1415

Korkisch, J., A. Thiard und **F. Hecht.** Schnellbestimmung des Urans in Meer- und Flußwässern 1422

Duval, C. Sur le noircissement des précipités de sels d'argent 1430

Duval, C. Remarque sur la nature du bismuthate de sodium 1432

Duval, C. Sur le nettoyage des cathodes dorées 1433

Holzer, K. Eine einfache Auftragpipette für die Papierchromatographie 1434

Mitteilungen aus chemischen Gesellschaften 1435

Buchbesprechungen 1439

Zehntes Heft

(Abgeschlossen am 18. Juni 1956)

Senise, P., and **Lilia Sant'Agostino.** Determination of Germanium After Extraction by Methyl Isobutyl Ketone. I 1445

Schöniger, W. Fortschrittsbericht über die organische Mikroelementaranalyse 1456

Westland, A. D., and **F. E. Beamish.** The Separation of Rhodium and Iridium on a Microscale 1474

Foreman, J. K. The Microdetermination of Carbon Dioxide, Oxygen, Carbon Monoxide, and Hydrogen in Gaseous Mixtures by the Krogh Method 1481

Inglis, A. S. A Note on the Microdetermination of Chlorine in Organic Compounds 1488

Pietsch, R. Nitratnachweis mit Phenarsazinsäure 1490

Beck, G. Nachweis der Lanthanone mit Dihydroxytartrat 1495

Seite

Kolšek, J. Beitrag zur quantitativen Bestimmung der Mutterkornalkaloide auf Papierchromatogrammen 1500

Sozzi, J. A., and **J. B. Niederl.** Lassaigne Test for Carbon 1512

Ziegler, M., und **O. Glemser.** Die gravimetrische Halbmikro-Bestimmung des Palladiums mit Violursäure 1515

Gallo, U., und **E. Mecarelli.** Die Titration in wasserfreiem Medium ... 1518

Ziegler, M., O. Glemser und **E. Preisler.** Die photometrische Mikrobestimmung des Kobalts als Tributylammoniumrhodanid 1526

Stephen, W. I. The Use of the Weisz Ring Oven in Electrographic Analysis 1531

Stephen, W. I. Contribution to Spot Colorimetry Using the Weisz Ring Oven 1540

Kuck, J. A., Patricia L. Altieri, and **Mignal Arnold.** A New Small-Sice Spherical Ground Joint for the Carbon-Hydrogen and Dumas Procedures 1544

Kuck, J. A., and **Patricia L. Altieri.** Spherical Ground Glass Joints vs. Rubber Tubing Connectors on the C and H Absorption Train 1550

Flaschenträger, B., und **M. S. Zein.** Objektträger und Mikroskopierschale zur Züchtung und Untersuchung von Kristallen mit dem Polarisationsmikroskop 1565

Buchbesprechungen 1568

Elftes Heft

(Abgeschlossen am 30. August 1956)

Karrman, K. J., and **Gillis Johansson.** High Frequency Titrimetry.. 1573

Karler, A., Charlotte L. Brown, and **P. L. Kirk.** A Microtechnique for Combined Analytical or Continuous Chromatography and Electrophoresis 1585

Brown, Charlotte L., and **P. L. Kirk.** Identification of Minute Amounts of Metals and Alloys by Electrosolution and Electrophoresis..... 1593

Maurmeyer, R. K., E. M. Livingston, and **R. Michaels.** Slide Test for Fructose and Other Ketohexoses 1600

Mitsui, T., and **H. Sato.** Microdetermination of Halogens in Organic Compounds 1603

Kirsten, W. J. Exchange Spectrophotometry. I. 1617

Lacourt, A., et **P. Heyndryckx.** Ultra microméthode de dosage direct du cuivre chromatographié sur papier 1621

Derkosch, J., F. X. Mayer † und **H. Neuninger.** Spektralanalytische Untersuchungen von urzeitlichen Kupferfunden..... 1649

Kolšek, J. Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide auf papierchromatographischem Wege 1662

Pietsch, R. Nitratbestimmung mit Phenarsazinsäure..... 1672

Kolšek, J. Quantitative Bestimmung einzelner wasserunlöslicher Alkaloide in Mutterkorn jugoslawischer Herkunft 1679

Lacourt, A., et **P. Heyndryckx.** Ultra microméthodes nouvelles de dosage direct du zinc sur papier 1685

Seite

Körbl, J. Verwendung des thermischen Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat in der organischen Elementaranalyse 1705

Fries, J., A. Holasek und **H. Lieb.** Der Nachweis ungesättigter Fettsäuren am Papierchromatogramm 1722

Mitteilungen aus chemischen Gesellschaften 1727

Buchbesprechungen 1727

Zwölftes Heft

(Abgeschlossen am 10. November 1956)

Brown, Charlotte L., and **P. L. Kirk.** Differentiation of Inks by Electrochromatophoresis 1729

Bobrański, B. Über eine neue automatische Apparatur zur Zentigramm-Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in organischen Substanzen 1735

Schleicher, A. Neue Verbesserungen der qualitativen Schnellanalyse. II. 1747

Gorbach, G., und **A. Haack.** Über die Genauigkeit von Mikromeßgeräten aus Glas und die Herstellung von Lösungen im Mikromaßstab 1751

Mázor, L. Direkte Sauerstoffbestimmung in fluorhaltigen organischen Verbindungen 1757

Jureček, M., und **M. Nepraš.** Mikronachweis des Kohlenstoffes in organischen und anorganischen Verbindungen mittels Magnesiumaufschlusses 1762

Guagnini, O. A., y **E. E. Vonesch.** Estudios sobre acidos hidroxámicos. VII. Reconocimiento específico de ésteres fórmicos, su investigación en mezclas, especialmente con otros ésteres carboxílicos 1767

Gorbach, G., und **H. Pfrimer.** Beiträge zur mikrochemischen Weinanalyse 1774

Kolšek, J. Beitrag zur mikroskopischen Untersuchung und Identifizierung der Mutterkornalkaloide. II. 1783

Pinta, M., et **Colette Bove.** Application de la spectrophotométrie de flamme à l'analyse du milieu végétal 1788

Coppini, D., Entwicklung analytischer Methoden für einige biologische Abbauprodukte des Tryptophans 1818

Ballezo, H., und **H. Schiffner.** Eine direkte mikrogravimetrische Fluorbestimmung mit Triphenylzinnchlorid 1829

Inglis, A. S. The Microdetermination of Sulphur in Organic Compounds 1834

Rogers, P. S., D. J. M. Bevan and **J. W. Tomlinson.** A Gas Volumetric Apparatus for the Determination of Milligram Quantities of Alkaline Earth Metals 1839

Belcher, R. Studies in Qualitative Inorganic Analysis. I. Introduction 1842

Belcher, R., and **H. Weisz.** Studies in Qualitative Inorganic Analysis. II. 1847

Weisz, H., and **F. Scott.** The Application of the Ring Oven Technique to Radioactive Substances 1856

Mitteilungen aus chemischen Gesellschaften 1858

Buchbesprechungen 1864

Sachregister — Subject Index — Table des matières 1867

Autorenverzeichnis

Abdine, H. siehe *Flaschka, H.* S. 770.
Abrahamczik, E. Ionenaustausch in der Mikroanalyse und bei präparativen Mikroarbeiten. S. 651.
Addink, N. W. H. Bestimmung von Spurenelementen (ohne chemische Vorbehandlung) und Analyse kleinster Materialmengen mittels spektrochemischer Methoden. S. 299.
Altieri, Patricia L. siehe *Kuck, J. A.* S. 1544, 1550.
Anastasi, Ada, Gallo, U. e *Mecarelli, E.* Determinazione di alcuni composti ossiantrachinonici a mezzo di titolazione in solventi non acquosi. S. 252.
Arnold, Mignal siehe *Kuck, J. A.* S. 1544.
Asbury, H., Belcher, R. and *West, T. S.* A Simple, Robust Ultramicrobalance. S. 598.
Asunción-Omarrementería, M. C. siehe *Burriel-Martí, F.* S. 362.
Auerhammer, S. siehe *Maucher, A.* S. 401.
Ayers, Cora W. Some Applications of the Use of the Reflectance Photodensitometer to Spot Test Analysis. S. 1333.
Ballczo, H. und *Doppler, G.* Die mikromaßanalytische Bariumsulfatbestimmung. S. 734.
Ballczo, H. und *Schiffner, H.* Eine direkte mikrogravimetrische Fluorbestimmung mit Triphenylzinnchlorid. S. 1829.
Barlot, J. Détermination microchimique de l'indium. S. 179.
Baró Graf, J. C. Sobre un nuevo complejo microquímico y su applicación a la investigación del Cu^{++}. S. 263.
Beamish, F. E. siehe *Westland, A. D.* S. 1474.
Beck, G. Die differenzierte, zeitliche Titration von Proteinen mit n/150 Kalium-cupri-3-tellurat. S. 977.
Beck, G. Nachweis der Lanthanone mit Dihydroxytartrat. S. 1495.
Belcher, R. Studies in Qualitative Inorganic Analysis. I. S. 1842.
Belcher, R. and *Bhatty, M. K.* The Elimination of the Distillation Procedure in the Kjeldahl Method. S. 1183.
Belcher, R. and *Macdonald, A. M. G.* The Microanalysis of Fluorine-Containing Organic Compounds. IV. S. 899.
Belcher, R. and *Macdonald, A. M. G.* The Microanalysis of Fluorine-Containing Organic Compounds. V. S. 1111.
Belcher, R. and *Macdonald, A. M. G.* The Microanalysis of Fluorine-Containing Organic Compounds. VI. S. 1187.
Belcher, R. and *Weisz, H.* Studies in Qualitative Inorganic Analysis. II. S. 1847.
Belcher, R. siehe *Asbury, H.* S. 598.
Benedetti-Pichler, A. A. Bei Präzisionswägungen zu beachtende Vorsichtsmaßregeln. S. 565.
Berisso, B. Sobre una nueva reacción microquímica que sirve para caracterizar y diferenciar mediante tecnicas microanalíticas adecuadas mercurio, iridio, indio, platino y oro. S. 812.
Bernhauer, K. siehe *Friedrich, W.* S. 134.
Bevan, D. J. M. siehe *Rogers, P. S.* S. 1839.

Beynon, J. H. The Use of the Mass Spectrometer for the Identification of Organic Compounds. S. 437.

Bhatty, M. K. siehe *Belcher, R.* S. 1183.

Bishop, E. Ultramicro Potentiometric Titrimetric Analysis. S. 619.

Blackman, L. C. F. Separation and Identification of Molybdenum and Tungsten. S. 1366.

Blažević, Kata siehe *Ruždić, I.* S. 288.

Blohm, S. G. and *Widmark, G.* Investigation of Monoterpenes by Micro Displacement Adsorption. S. 184.

Bobrański, B. Über eine neue automatische Apparatur zur Zentigramm-Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in organischen Substanzen. S. 1735.

Bove, Colette siehe *Pinta, M.* S. 1788.

Brandstätter, Maria, Phasenkontrastmikroskopische Studien zum Kristallwachstum. S. 154.

Brandstätter, Maria und *Grimm, H.* Beitrag zur Polymorphie organischer Verbindungen. S. 1175.

Breitenbach, J. W. siehe *Forster, E. L.* S. 982.

Brown, Charlotte L. siehe *Karler, A. S.* S. 1585.

Brown, Charlotte L. and *Kirk, P. L.* Differentiation of Inks by Electrochromatophoresis. S. 1729.

Brown, Charlotte L. and *Kirk, P. L.* Identification of Minute Amounts of Metals and Alloys by Electrosolution and Electrophoresis. S. 1593.

Bruninx, E., Eeckhout, J. et *Gillis, J.* Séparation du niobium et du tantale par chromatographie sur papier. S. 689.

Burriel-Marti, F., Ramirez-Muñoz, J. et *Asunción-Omarrementería, M. C.* Applications de la photométrie de flamme à l'analyse des éléments différents aux alcalins et alcalino-terreux. S. 362.

Burton, J. D. and *Riley, J. P.* Determination of Soluble Phosphate, and Total Phosphorus in Sea-Water and of Total Phosphorus in Marine Muds. S. 1350.

Caldas, A. siehe *Feigl, F.* S. 1310.

Caspersson, T. Quantitative ultramikrospektrographische Verfahren. S. 1.

Cavicchi Sandri, Gilda. Sul riconoscimento microchimica della β-fenil isopropilamina. S. 244.

Cheronis, N. D. Recent Advances in the Application of Micromethods to the Identification of Organic Compounds. S. 925.

Cheronis, N. D. The Use of Microtechnique in the Teaching of Chemistry. S. 202.

Clark, S. J. and *Morgan, D. J.* The Spectrophotometric Determination of Secondary Aliphatic Amines. S. 966.

Coppini, D. Entwicklung analytischer Methoden für einige biologische Abbauprodukte des Tryptophans. S. 1818.

Cruikshank, St. S. siehe *Rush, C. A.* S. 858.

Dangl, F. Bemerkungen zur Lumineszenzmikroskopie. S. 1105.

Dat Xuong, N. siehe *Duval, C.* S. 747.

Dauschan, W. siehe *Rasin-Streden, R.* S. 512.

Demmel, H. siehe *Gorbach, G.* S. 1264.

Derkosch, J., Mayer †, *F. X.* und *Neuninger, H.* Spektralanalytische Untersuchungen von urzeitlichen Kupferfunden. S. 1649.

Derkosch, J. und *Weiser, M.* Die Ausstellung mikrochemischer Geräte im Rahmen der Mikrochemie-Tagung 1955. S. 1096.

Doiwa, A. siehe *Fischer, J.* S. 353.

Doppler, G. siehe *Ballczo, H.* S. 734.

Dupuis, Thérèse. Etude des réactions de l'acétylformazyle et de ses dérivés avec les ions minéraux. S. 1415.

Duval, C. Premières applications des spectres d'absorption infrarouges réalisés sur une goutte de solution aqueuse. S. 741.

Duval, C. Remarque sur la nature du bismuthate de sodium. S. 1432.

Duval, C. Sur le nettoyage des cathodes dorées. S. 1433.
Duval, C. Sur le noircissement des précipités de sels d'argent. S. 1430.
Duval, C. et *Dat Xuong, N.* Emploi des thiocarbohydrazones en analyse organique fonctionelle. S. 747.
Duval, C. et *Lecomte, J.* Interprétation des spectres d'absorption infrarouges de phosphites et d'hypophosphites métalliques. S. 454.
Duval, C. et *Loc, T. B.* Premières applications de thiocarbohydrazide en chimie minérale. S. 458.
Eeckhout, J. siehe *Bruninx, E.* S. 689.
Feigl, F. and *Caldas, A.* Some Applications of Fusion Reactions with Zinc Chloride in Inorganic Spot Test Analysis. S. 1310.
Feigl, F. und *Goldstein, D.* Nachweis von Kohlenstoff in der Tüpfelanalyse. S. 1317.
Ferrari, C. Neue Ergebnisse zur Mikrobestimmung der Phosphorsäure und ihre Anwendung zur Bestimmung der leichtest löslichen Phosphate in Böden. S. 551.
Fischer, J. und *Doiwa, A.* Zum Problem der Partner bei der Flammenspektrometrie. S. 353.
Flaschenträger, B. und *Zein, M. S.* Objektträger und Mikroskopierschale zur Züchtung und Untersuchung von Kristallen mit dem Polarisationsmikroskop. S. 1565.
Flaschka, H. Extraktionsanalytische Verwendung des nicht sulfonierten Eriochromschwarz T. S. 784.
Flaschka, H. und *Abdine, H.* Mikrotitrationen mit Äthylendiamintetraessigsäure. XV. S. 770.
Flaschka, H. und *Laßner, E.* Über die kolorimetrische Bestimmung von Niob mit Tiron. S. 778.
Forman, J. K. The Microdetermination of Carbon Dioxide, Oxygen, Carbon Monoxide, and Hydrogen in Gaseous Mixtures by the Krogh Method. S. 1481.
Forster, E. L. und *Breitenbach, J. W.* Osmotische Messungen mit Mikromengen hochpolymerer Stoffe. S. 982.
Friedrich, W., Groß, Gisela und *Bernhauer, K.* Zur chromatographischen Trennung der Vitamine der B_{12}-Gruppe. II. S. 134.
Fries, J., Holasek, A. und *Lieb, H.* Der Nachweis ungesättigter Fettsäuren am Papierchromatogramm. S. 1722.
Gabler, F. Ein Beitrag zur Fernsehmikroskopie. S. 638.
Gallo, U. siehe *Anastasi, Ada.* S. 252.
Gallo, U. und *Mecarelli, E.* Die Titration in wasserfreiem Medium. S. 1518.
Giefer, Lieselotte siehe *Nielsch, W.* S. 522.
Gillis, J. siehe *Bruninx, E.* S. 689.
Gillis, J., Van der Stock, J. et *Hoste, J.* Dosage microgravimétrique et spectrophotométrique du calcium par la lorétine. S. 760.
Glemser, O. siehe *Ziegler, M.* S. 1152, 1515, 1526.
Goldstein, D. siehe *Feigl, F.* S. 1317.
Gorbach, G. und *Demmel, H.* Beiträge zur quantitativen „Test Tube"-Papierchromatographie. S. 1264.
Gorbach, G. und *Haack, A.* Über die Genauigkeit von Mikromeßgeräten aus Glas und die Herstellung von Lösungen im Mikromaßstab. S. 1751.
Gorbach, G. und *Pfrimer, H.* Beiträge zur mikrochemischen Weinanalyse. S. 1774.
Götte, H. Anwendung der Radioaktivität in der analytischen Chemie. S. 27.
Gremm, W siehe *Seith* †, *W.* S. 339.
Grimm, H. siehe *Brandstätter, M.* S. 1175.
Groß, Gisela siehe *Friedrich, W.* S. 134.
Guagnini, O. A. y *Vonesch, E. E.* Estudios sobre acidos hidroxámicos. VII. Reconocimiento específicos de ésteres fórmicos, su investigación en mezclas, especialmente con otros ésteres carboxílicos. S. 1767.
Gysel, H. Unbewußte und bewußte Schätzungsanomalien beim Wägen und ihre Auswirkungen auf die Genauigkeit von Mikroanalysen. S. 577.
Haack, A. siehe *Gorbach, G.* S. 1751.

Haack, A. siehe *Schöniger, W.* S. 1369.
Hamm, R. Über die Bestimmung von Calcium, Magnesium, Zink und Eisen in tierischem Gewebe. S. 268.
Hänni, H. Die mikrochemische Jodbestimmung in Milch und Milchprodukten. S. 257.
Hansen, G. Spektrophotometrische Messung an kleinsten Flüssigkeitsmengen. S. 406.
Hecht, F. siehe *Korkisch, J.* S. 1230, 1422.
Hecht, F., Korkisch, J., Patzak, R. und *Thiard, A.* Zur Bestimmung kleinster Uranmengen in Gesteinen und natürlichen Wässern. S. 1283.
Hegedüs, A. J. siehe *Pungor, E.* S. 1247.
Heyndryckx, P. siehe *Lacourt, A.* S. 1211, 1389, 1621, 1685.
Hintenberger, H. Anwendung der Massenspektroskopie in der analytischen Chemie. S. 71.
Hodsman, G. F. Microchemical Balance Design. S. 591.
Holasek, A. siehe *Fries, J.* S. 1722.
Holasek, A., Lieb, H. und *Merz, W.* Zur mikroanalytischen Bestimmung von Cystin und Methionin. S. 1216.
Holdt, G. Zur Genauigkeit der Glimmschichtmethode (cathode arc layer). S. 311.
Holzer, K. Eine einfache Auftragpipette für die Papierchromatographie. S. 1434.
Hoste, J. siehe *Gillis, J.* S. 760.
Hoste, J. siehe *Kosta, L.* S. 790.
Hoste, J. and *van den Berghe, H.* Determination of Micro-Amounts of Indium in Zinc and in Gallium by Radioactivation. S. 797.
Inglis, A. S. A Note on the Microdetermination of Chlorine in Organic Compounds. S. 1488.
Inglis, A. S. The Microdetermination of Sulphur in Organic Compounds. S. 1834.
Ingram, G. Some Further Deliberations on the Rapid Combustion Procedure. S. 877.
Janák, J. Systematische chromatographische Mikroanalyse der Gase. S. 1038.
Johansson, G. siehe *Karrman, K. J.* S. 1573.
Jureček, M. und *Nepraš, M.* Mikronachweis des Kohlenstoffes in organischen und anorganischen Verbindungen mittels Magnesiumaufschlusses. S. 1762.
Kainz, G., Resch, A. und *Schöller, F.* Über die Verwendung von Kupfer bei der Mikro-C-H-Bestimmung. S. 850.
Kainz, G. und *Schöller, F.* Mikrobestimmung des Fluors in organischen Substanzen. S. 843.
Kakihana, H. Microchemical Detection of Several Elements Using Ion-Exchange Resin. S. 682.
Karler, A., Brown, Charlotte L. and *Kirk, P. L.* A Microtechnique for Combined Analytical or Continuous Chromatography and Electrophoresis. S. 1585.
Karrman, K. J. and *Johansson, G.* High Frequency Titrimetry. S. 1573.
Karrman, K. J. siehe *Sunner, S.* S. 1144.
Keler-Bačoka, Mira. Der Sublimattest als Mikromethode zur Bestimmung der γ-Globuline im Serum. S. 237.
Kirk, P. L. siehe *Brown, Charlotte L.* S. 1593, 1729.
Kirk, P. L. siehe *Karler, A.* S. 1585.
Kirsten, W. J. Exchange Spectrophotometry. I. S. 1617.
Kirsten, W. J. Einige Ultramikromethoden in der quantitativen organischen Elementaranalyse. S. 836.
Kolšek, J. Beitrag zur mikroskopischen Untersuchung und Identifizierung der Mutterkornalkaloide. S. 1193.
Kolšek, J. Beitrag zur mikroskopischen Untersuchung und Identifizierung der Mutterkornalkaloide. II. S. 1783.
Kolšek, J. Beitrag zur papierchromatographischen Bestimmung der Mutterkornalkaloide. S. 1377.
Kolšek, J. Beitrag zur quantitativen Bestimmung der Mutterkornalkaloide auf Papierchromatogrammen. S. 1500.

Kolšek, J. Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der wasserunlöslichen Mutterkornalkaloide auf papierchromatographischem Wege. S. 1662.

Kolšek, J. Quantitative Bestimmung einzelner wasserunlöslicher Alkaloide im Mutterkorn jugoslawischer Herkunft. S. 1679.

Konkoly Thege, I. siehe *Pungor, E.* S. 1247.

Körbl, J. Verwendung des thermischen Zersetzungsproduktes von Silberpermanganat in der organischen Elementaranalyse. S. 1705.

Korkisch, J. siehe *Hecht, F.* S. 1283.

Korkisch, J. und *Hecht, F.* Trennung des Galliums von dreiwertigem Eisen mittels Ionenaustausches. S. 1230.

Korkisch, J., Thiard, A. und *Hecht, F.* Schnellbestimmung des Urans in Meer- und Flußwässern. S. 1422.

Kosta, L. and *Hoste, J.* The Separation of Micro-Amounts of Indium from Zinc by Liquid-Liquid Extraction. S. 790.

Kratzl, K. Über den mikroanalytischen Nachweis des Lignins. S. 159.

Kuck, J. A. and *Altieri, Patricia L.* Spherical Ground Glass Joints vs. Rubber Tubing Connectors on the C and H Absorption Train. S. 1550.

Kuck, J. A., Altieri, Patricia L. and *Arnold, Mignal.* A New Small-Size Spherical Ground Joint for the Carbon-Hydrogen and Dumas Procedures. S. 1544.

Lacourt, A. La chromatographie quantitative sur papier, technique typiquement microchimique. S. 700.

Lacourt, A. and *Heyndryckx, P.* Paper Chromatography Leads to Improved Reproducibility of Results. S. 1211.

Lacourt, A. et *Heyndryckx, P.* Mise au point du microdosage spectrophotométrique direct du cobalt sur papier. S. 1389.

Lacourt, A. et *Heyndryckx, P.* Ultra microméthode de dosage direct du cuivre chromatographié sur papier. S. 1621.

Lacourt, A. et *Heyndryckx, P.* Ultra microméthodes nouvelles de dosage direct du zinc sur papier. S. 1685.

Ladenbauer, Inge-Maria siehe *Slama, O.* S. 1238.

Ladenbauer, Inge-Maria und *Slama, O.* Fluorometrische Mikrobestimmung des Galliums mit Dibromoxin. S. 1219.

de Laffolie, H. Über die Nachweisgrenze in der Spektralanalyse. S. 304.

Laßner, E. siehe *Flaschka, H.* S. 778.

Lecomte, J. siehe *Duval, C.* S. 454.

Lederer, M. Anorganische Papierchromatographie. S. 43.

Lévy, R. Microdosage des halogènes dans les composés organiques. S. 906.

Lieb, H. siehe *Fries, J.* S. 1722.

Lieb, H. siehe *Holasek, A.* S. 1216.

Lieb, H. siehe *Spitzy, H.* S. 273.

Livingston, E. M. siehe *Maurmeyer, R. K.* S. 1600.

Loc, T. B. siehe *Duval, C.* S. 458.

López de Azcona, J. M. Valoración espectrográfica de rubidio y estroncio en las micas. S. 334.

Lüdy-Tenger, F. Versuche über mikrochemische und mikrophysikalische Prüfungsmöglichkeiten an medizinisch wichtigen Pyridin-Derivaten. S. 104.

Luís, P. y *Niederl, J. B.* Reconocimiento de nicotina en una hebrita de tabaco. S. 948.

Ma, T. S. and *Sweeney, R. F.* Microchemistry for the Organic Chemist: A Postgraduate Training Program. S. 191.

Macdonald, A. M. G. siehe *Belcher, R.* S. 899, 1111, 1187.

Malissa, H. Beiträge zur Mikromethodik in der Eisenforschung. S. 474.

Maucher, A. und *Auerhammer, S.* Spektralanalytische Bestimmung kleiner Einschlüsse in Gesteinen mittels Hochfrequenzanregung. S. 401.

Maurmeyer, R. K., Livingston, E. M. and *Michaels, R.* Slide Test for Fructose and Other Ketohexoses. S. 1600.

Mayer †, *F. X.* Anwendung mikrochemischer Methoden in der Kriminalistik. S. 226.
Mayer †, *F. X.* siehe *Derkosch, J.* S. 1649.
Mayer †, *F. X.* und *Schweda, P.* Studien zur quantitativen Bestimmung von Mikrogrammengen Blei. S. 485.
Mázor, L. Direkte Sauerstoffbestimmung in fluorhaltigen organischen Verbindungen. S. 1757.
Mecarelli, E. siehe *Anastasi, Ada.* S. 252.
Mecarelli, E. siehe *Gallo, U.* S. 1518.
Merz, W. siehe *Holasek, A.* S. 1216.
Michaels, R. siehe *Maurmeyer, R. K.* S. 1600.
Michl, H. Mikroelektrophorese. S. 54.
Mitchell Jr., J. and *Ryland, Ada L.* Identification of Organic Compounds by Microscopy and X-Ray Diffractometry. S. 422.
Mitsui, T. and *Sato, H.* Microdetermination of Halogens in Organic Compounds. S. 1603.
Monnier, D. siehe *Wenger, P. E.* S. 1075.
Morgan, D. J. siehe *Clark, S. J.* S. 966.
Mulay, V. N. siehe *Shah, G. D.* S. 1140.
Nepraš, M. siehe *Jureček, M.* S. 1762.
Neu, R. Mikrogrammnachweis von 3-Hydroxyflavonen mit aromatischen Diarylborsäuren. S. 1169.
Neuninger, H. siehe *Derkosch, J.* S. 1649.
Niederl, J. B. siehe *Luis, P.* S. 948.
Niederl, J. B. siehe *Sozzi, J. A.* S. 1512.
Nielsch, W. und *Giefer, Lieselotte.* Photometrische Nickelbestimmung mit Natriumdimethylglyoxim. S. 522.
Nietsch, B. Nachweis von Erdölprodukten in natürlichen Wässern durch Fluoreszenz. S. 171.
Oosting, M. Eine neue selektive und empfindliche Wismutbestimmung. S. 528.
Otter, I. Methoden zur Rückstandsbestimmung von Insektiziden in pflanzlichem Material. S. 125.
Owen, W. S. and *Reid, W. M.* Apparatus for the Determination of Melting Points and Boiling Points. S. 1373.
Pansare, V. S. siehe *Shah, G. D.* S. 1140.
Patzak, R. siehe *Hecht, F.* S. 1283.
Pavelka, F. und *Pieruccini, R.* Untersuchungen über die Aluminiumsperrschicht. S. 535.
Peters, K. Über die Anwendung des Gegenstromprinzips in der Mikrogasanalyse. S. 1023.
Pfeilsticker, K. Eine spektrochemische Mikrobestimmung des Bleis in biologischem Material. S. 319.
Pfrimer, H. siehe *Gorbach, G.* S. 1774.
Pieruccini, R. siehe *Pavelka, F.* S. 535.
Pietsch, R. Nitratbestimmung mit Phenarsazinsäure. S. 1672.
Pietsch, R. Nitratnachweis mit Phenarsazinsäure. S. 1490.
Pinta, M. et *Bove, Colette.* Application de la spectrophotométrie de flamme à l'analyse du milieu végétal. S. 1788.
Pirsch, J. Beitrag zur Frage der Gitterkräfte organischer Moleküle. S. 992.
Pohl, F. A. Mikromethoden in der Halbleiterforschung. S. 414.
Preisler, E. siehe *Ziegler, M.* S. 1526.
Preuss, E. Zur Spektralanalyse kleiner Substanzmengen. S. 382.
Pungor, E., Hegedüs, A. J., Konkoly Thege, I. und *Zapp, E. É.* Über die Rolle der Flammentemperatur bei der flammenphotometrischen Analyse der Alkalimetalle. S. 1247.
Pungor, E. siehe *Schulek, E.* S. 1005, 1116, 1120.
Ramirez-Muñoz, J. siehe *Burriel-Marti, F.* S. 362.
Rasin-Streden, R., Dauschan, W. und *Zemek, O.* Eine photometrische Bestimmung des Samariums in Ceriterdengemischen. S. 512.
Reichl, E. R. Papierchromatographische Strukturanalyse. S. 955.
Reid, W. M. siehe *Owen, W. S.* S. 1373.
Resch, A. siehe *Kainz, G.* S. 850.

Rhodes, Erna J. H. siehe *Rush, C. A.* S. 858.
Riley, J. P. siehe *Burton, J. D.* S. 1350.
Rogers, P. S., Bevan, D. J. M. and *Tomlinson, J. W.* A Gas Volumetric Apparatus for the Determination of Milligram Quantities of Alkaline Earth Metals. S. 1839.
Rost, F. Zur Spektralanalyse von Siliciumcarbid. S. 343.
Rush, C. A., Cruikshank, St. S. and *Rhodes, Erna J. H.* Microanalysis of Perfluoro Compounds. S. 858.
Ruždić, I. ind *Blažević, Kata.* Die spektrometrische Bestimmung des Kupfers im Serum. S. 288.
Ryland, Ada L. siehe *Mitchell Jr., J.* S. 422.
Sant'Agostino, Lilia siehe *Senise, P.* S. 1445.
Sato, H. siehe *Mitsui, T.* S. 1603.
Scheid, H. Die Preglsche Präzisionswägepipette und ihre Verwendung in der Medizin. S. 630.
Schiffner, H. siehe *Ballczo, H.* S. 1829.
Schleicher, A. Neue Verbesserungen der qualitativen Schnellanalyse. S. 663.
Schleicher, A. Neue Verbesserungen der qualitativen Schnellanalyse. II. S. 1747.
Schöller, F. siehe *Kainz, G.* S. 843, 850.
Schönfeld, T. Beiträge der Radiochemie zur Theorie der chemischen Analyse. S. 1050.
Schöniger, W. Beitrag zur mikroanalytischen Sauerstoffbestimmung nach Unterzaucher. S. 863.
Schöniger, W. Die mikroanalytische Schnellbestimmung von Halogenen und Schwefel in organischen Verbindungen. S. 869.
Schöniger, W. Fortschrittsbericht über die organische Mikroelementaranalyse. S. 1456.
Schöniger, W. und *Haack, A.* Ein bewährtes Destillationsgerät für die mikroanalytische Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl. S. 1369.
Schulek, E. und *Pungor, E.* Neue Wege in der Gasanalyse. II. S. 1120.
Schulek, E. und *Pungor, E.* Über das Mangan(II)-carbonat und einige seiner gasanalytisch wertvollen Eigenschaften. S. 1116.
Schulek, E., Pungor, E. und *Trompler, J.* Neue Wege in der Gasanalyse. S. 1005.
Schüller, H. Über die Bestimmung der Spurenelemente in der Agrikulturchemie. S. 393.
Schweda, P. siehe *Mayer* †, *F. X.* S. 485.
Scott, F. siehe *Weisz, H.* S. 1856.
Seith †, *W.* und *Gremm, W.* Spektralanalytischer Spurennachweis nach Anreicherung durch innere Elektrolyse. S. 339.
Senise, P. and *Sant'Agostino, Lilia.* Determination of Germanium After Extraction by Methyl Isobutyl Ketone. I. S. 1445.
Servigne, Yvette. Etudes micro-analytiques des ions oxyhalogénés par chromatographie et absorption infrarouge. S. 750.
Shah, G. D., Pansare, V. S. and *Mulay, V. N.* A Modified Micro-Dumas Method for Rapid Determination of Nitrogen. S. 1140.
Simon, S. L'utilisation des méthodes microanalytiques dans l'analyse des spécialités pharmaceutique. S. 118.
Slama, O. siehe *Ladenbauer, Inge-Maria.* S. 1219.
Slama, O. und *Ladenbauer, Inge-Maria.* Papierchromatographische Trennung des Galliums von Eisen, Titan und Aluminium und seine fluorometrische Bestimmung mit 5,7-Dibrom-8-hydroxychinolin. S. 1238.
Sozzi, J. A. and *Niederl, J. B.* Lassaigne Test for Carbon. S. 1512.
Spitzy, H. und *Lieb, H.* Zur Methodik der Blutjodbestimmung. S. 273.
Stephen, W. I. Contribution to Spot Colorimetry Using the Weisz Ring Oven. S. 1540.
Stephen, W. I. The Use of the Weisz Ring Oven in Electrographic Analysis. S. 1531.

Sternberg, J. An Automatic Device for Quantitative Estimate of Paper Electrophoresis and Radioelectrophoresis. S. 462.
Stratmann, H. Mikroanalytische Bestimmung verschiedener Schwefelverbindungen in Gasen und in festen Stoffen. S. 1031.
Struck, H. Papierchromatographische Trennung von Aldehyden mittels ihrer Reaktion mit Benzsulfhydroxamsäure. S. 1277.
Sundén, V. siehe *Sunner, S.* S. 1144.
Sunner, S., Karrman, K. J. and *Sundén, V.* Separation of Mercaptans by Gas-Liquid Partition Chromatography. S. 1144.
Suter, H. A. and *Suter, Patricia H.* A Selective Spot Test for Nitrate Ion. S. 1136.
Suter, Patricia H. siehe *Suter, H. A.* S. 1136.
Svensson, G. Bestimmung von Absorption und Brechungsindex extrem hoch absorbierender Lösungen im Mikromaßstab. S. 645.
Sverak, L. Eine einfache und empfindliche Methode zur Bestimmung von Radiokohlenstoff (^{14}C). S. 1068.
Sweeney, R. F. siehe *Ma, T. S.* S. 191.
Sykes, A. The Determination of Metals in Organic Compounds. S. 1155.
Thiard, A. siehe *Hecht, F.* S. 1283.
Thiard, A. siehe *Korkisch, J.* S. 1422.
Tomlinson, J. W. siehe *Rogers, P. S.* S. 1839.
Trompler, J. siehe *Schulek, E.* S. 1005.
Unterzaucher, J. Über kristallisierte Anhydrojodsäure als Oxydationsmittel bei der direkten Mikrosauerstoffbestimmung in organischen Substanzen. S. 822.
Vagnina, L. L. The Application of Microchemistry in Forensic Chemistry. S. 221.
Van den Berghe, H. siehe *Hoste, J.* S. 797.
Van der Stock, J. siehe *Gillis, J.* S. 760.
Villagrán, Mª del Pilar, siehe *Vioque, A.* S. 804.
Vioque, A. y *Villagrán, Mª del Pilar.* Elementos trazas en grasas comestibles. II. S. 804.
Vonesch, E. E. siehe *Guagnini, O. A.* S. 1767.
Weiser, M. siehe *Derkosch, J.* S. 1096.
Weisz, H. Die Ringofenmethode. S. 667.
Weisz, H. Zum Nachweis von Chlorid, Bromid, Jodid und Thiocyanat. S. 1225.
Weisz, H. and *Scott, F.* The Application of the Ring Oven Technique to Radioactive Substances. S. 1856.
Weisz, H. siehe *Belcher, R.* S. 1847.
Wenger, P. E. et *Monnier, D.* Méthodes de séparation microchimiques quantitatives. S. 1075.
West, T. S. siehe *Asbury, H.* S. 598.
Westland, A. D. and *Beamish, F. E.* The Separation of Rhodium and Iridium on a Microscale. S. 1474.
Widmark, G. siehe *Blohm, S. G.* S. 184.
Wilson, C. L. Ultramicroanalysis: Past, Present, and Future. S. 91.
Zapp, E. É. siehe *Pungor, E.* S. 1247.
Zein, M. S. siehe *Flaschenträger, B.* S. 1565.
Zemek, O. siehe *Rasin-Streden, R.* S. 512.
Ziegler, M. und *Glemser, O.* Die gravimetrische Halbmikro-Bestimmung des Palladiums mit Violursäure. S. 1515.
Ziegler, M. und *Glemser, O.* Über den Nachweis von Palladium mit Violursäure. S. 1152.
Ziegler, M., Glemser, O. und *Preisler, E.* Die photometrische Mikrobestimmung des Kobalts als Tributylammoniumrhodanid. S. 1526.

Institut für Medizinische Zellforschung und Genetik, Medizinisches Nobel-Institut, Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden

Quantitative ultramikrospektrographische Verfahren

Von

Torbjörn Caspersson

Mit 9 Abbildungen

(Eingelangt am 16. Mai 1955)

Das Studium der Prozesse, die in der einzelnen Zelle ablaufen und die Grundlage für die Lebensvorgänge bilden, stellt die Mikrochemie vor eine Reihe spezieller Probleme. Die Objekte, um die es geht, sind besonders klein. Die komplizierte Struktur, die allen lebenden Zellen eigen ist, baut sich aus Elementen auf, deren Größenordnung sich vom Bereich der Makromoleküle — ungefähr 0,1 μ — bis hinauf zu einem oder mehreren μ erstreckt. Die Zelle arbeitet, chemisch gesehen, wie eine äußerst komplizierte Maschine, bei der verschiedenen Zellteilen verschiedene Aufgaben zukommen. Bestimmte chemische Prozesse liefern Energie für andere. So wird z. B. durch den Atmungsablauf Energie für die Syntheseprozesse frei, die ihrerseits die Unterlage für so zentrale Funktionen der lebenden Materie schaffen wie Vermehrung, Wachstum und Differenzierung. Um in die Wirkungsweise des chemischen Strukturaufbaues der Zelle eindringen zu können, ist es natürlich notwendig, dieses heterogene Reaktionsmilieu zu analysieren und die Hauptzüge der chemischen Zusammensetzung von Zellelementen während verschiedener Funktionszustände zu kartieren. Es ist nicht primär erforderlich, mit der Analyse unmittelbar bis in den Bereich der Makromoleküle vorzudringen. Die größeren Organellen der Zelle in durchschnittlichen Tier- und Pflanzenorganismen, von denen man annehmen kann, daß sie spezielle chemische Funktionen ausüben, liegen etwa in der Größenordnung von 1 μ (vgl. Abb. 1).

Die Größenordnung von 1 μ, die einem Gewicht von 10^{-12} g entspricht, liegt weit außerhalb des Anwendungsgebietes gewöhnlicher mikrochemischer Arbeitsweisen und es ist natürlich zu erwarten, daß wirklich quantitative Methoden zumindest recht kompliziert sein werden. Es

scheint jedoch unumgänglich notwendig, diesen Weg zu gehen. Unser Wissen von den chemischen Prozessen in lebenden Organismen ist während der letzten Jahrzehnte unerhört erweitert worden, aber der weitaus überwiegende Teil des Beobachtungsmateriales stammt von Untersuchungen in der Milligrammskala und enthält also Millionen von Zellen. Diese

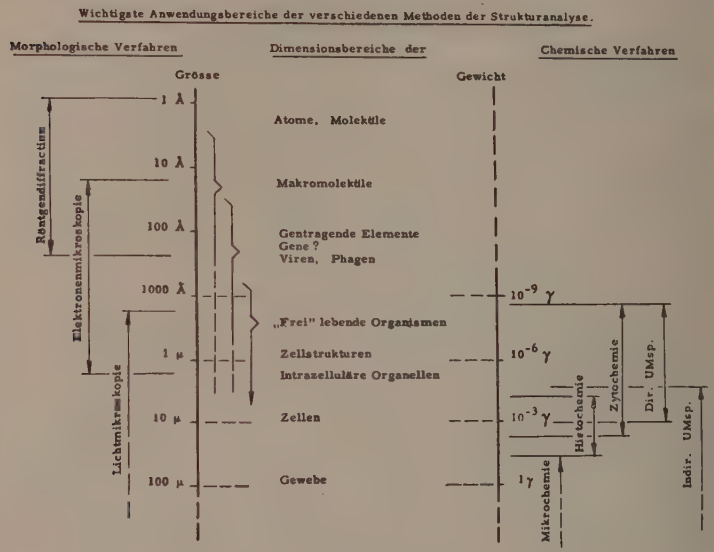


Abb. 1

Untersuchungen berücksichtigen auf keine Weise das heterogene Reaktionsmilieu in einzelnen Zellen und Zellgruppen. Beurteilt man kritisch das gesammelte Wissen der modernen Biochemie, so zeigt sich schlagend, daß der weitaus überwiegende Teil unseres Wissens auf bestimmte Arten von Prozessen begrenzt ist, und zwar gerade auf solche, für welche die Unversehrtheit der Zellstrukturen keine unumgängliche Voraussetzung ist. Ein klares Beispiel dafür bieten die Atmungsprozesse, die weitgehend in Lösungen oder mit Zellhomogenaten imitiert werden können. Ganz anders liegen die Verhältnisse bei den meisten aufbauenden Prozessen, insbesondere dem zentralen Prozeß in aller lebenden Materie, dem Aufbau neuer Eiweißstoffe, der als Grundlage aller Wachstums- und Vermehrungsvorgänge im Mittelpunkt des Interesses steht. Während der letzten Jahre hat gerade dieser Prozeß an Bedeutung für das Problem des pathologischen Zellwachstums gewonnen. *Um tiefer in das Wissen von solchen strukturbedingten Syntheseprozessen eindringen zu können, ist es*

offenbar notwendig, die makrochemischen Verfahren durch Methoden zu ergänzen, die die Untersuchung von Elementen im genannten Größenbereich von 1 μ zulassen.

Im Prinzip ist es möglich, hierfür verschiedene Wege einzuschlagen:

1. Isolierung bestimmter Zellstrukturen aus so großen Zellmengen, daß sie mit gewöhnlichen mikrochemischen Methoden analysiert werden können.

2. Direkte Bestimmung von Substanzen mit Hochauflösungsmethoden in der intakten Zellstruktur. Ferner

3. ein Kompromißweg, der in Zukunft eine immer größere Rolle spielen dürfte: die Isolierung bestimmter Strukturen aus einer kleinen Anzahl einzelner Zellen und deren Untersuchung mit Hochauflösungsmethoden, wie sie unter 2 genannt wurden.

Die Isolierungsmethoden in der Makroskala sind während der letzten Jahrzehnte sehr entwickelt worden. Die Fehlerquellen sind jedoch außerordentlich groß und man kann darum positive Resultate nur für gröbere Bestimmungen erwarten, wie für Untersuchungen von Zellelementen, die einen großen Anteil der Zellmasse ausmachen, z. B. von Zellkernen oder Mitochondriensystemen. Die hauptsächlichsten Fehlerquellen liegen in der Herauslösung von Substanz bei der Präparation und dem Risiko der Adhäsion umgebenden Materials an das isolierte Zellelement, z. B. an den Zellkern. Es ist technisch unmöglich, jeden einzelnen der Millionen Zellkerne in einem solchen Präparat mikroskopisch zu kontrollieren. Diese Nachteile hängen in minderem Maß den Methoden an, die unter Ziffer 3 aufgeführt wurden und die außerordentliche Entwicklungsmöglichkeiten bieten. Besonders muß auf die Anwendbarkeit des Infrarotmikroskopes für diese Zwecke hingewiesen werden.

Die unter 2 angeführten Methoden erfordern eine so bedeutende Verfeinerung der chemischen Bestimmung, daß die Messungen am Objekt direkt an dessen Platz innerhalb der Zellstrukturen ausgeführt werden können. Das bringt den außerordentlichen Vorteil, daß Manipulationen mit den minimalen Objekten in den geringst möglichen Grenzen gehalten werden. Ein solches Verfahren bietet die allerbesten Voraussetzungen für die Arbeit mit sehr hoher Auflösung. Aber dieser Vorteil geht auf Kosten der Universalität der Methoden — es dürften kaum andere in Frage kommen als optische — und darum ist das Anwendungsgebiet auf Stoffe mit eigener Absorption in irgendeinem Teil des elektromagnetischen Spektrums begrenzt, soweit solche Absorptionen nicht durch chemische Bindungen oder Färbung erzeugt werden können.

Die Methoden, die im weiteren beschrieben werden sollen, fallen alle unter diese Kategorie. Durch Ausnutzen der Analysenmöglichkeiten in großen Gebieten des elektromagnetischen Spektrums kann

eine relativ umfassende Gruppe von Untersuchungsverfahren ausgebaut werden.

Ultramikrospektrographische Methoden für quantitative cytochemische Bestimmungen

In der Cytochemie, wie auch in allen anderen Zweigen der Naturwissenschaft ist die Möglichkeit zu raschen Fortschritten wesentlich an die Entwicklung *quantitativer* Arbeitsmethoden geknüpft. *Qualitative* cytochemische Methoden, die in der Regel auf visueller optischer Analyse von Farbreaktionen basieren, wurden während der letzten 50 Jahre in großem Umfange entwickelt. Aber auf Grund der schwierigen Manipulationen mit Zellmaterial und der außerordentlich kleinen Dimensionen der Objekte haben diese qualitativen Untersuchungen sehr wenig zur Erweiterung unseres Wissens beigetragen, besonders wenn man den großen Arbeitseinsatz auf diesem Gebiet in Rechnung zieht. Diese Verfahren scheinen auch nur in begrenztem Umfang entwicklungsfähig zu sein, und darum soll hier nicht näher auf sie eingegangen werden.

Ein Ultramikrospektrograph für das optische Gebiet ist im Prinzip die Kombination eines Mikroskops mit einem Spektrographen (Abb. 2);

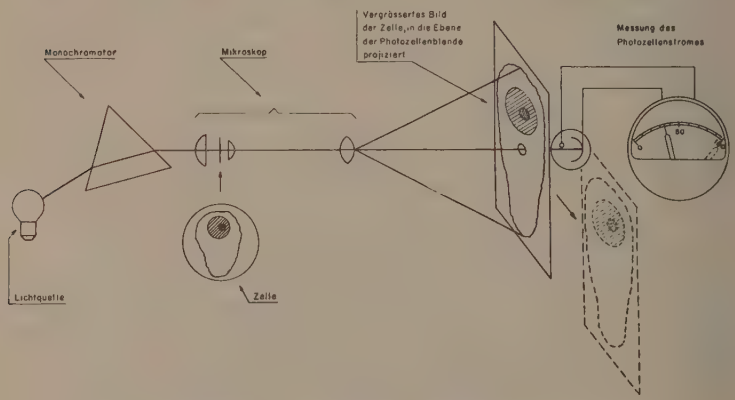


Abb. 2. Prinzipschema der photoelektrischen Ultramikrospektrophotometrie

mit ihm kann der Verlauf des Absorptionsspektrums sehr kleiner Objekte quantitativ bestimmt werden. Der Hauptteil der Untersuchungen, wie sie bisher mit dieser Methode — die vor etwa 20 Jahren entwickelt worden ist — durchgeführt wurden, betrafen das Nukleinsäuren- und Eiweißverteilungsproblem unter Ausnutzung der selektiven Absorptionen dieser Substanzklassen im mittleren Ultraviolett (*Caspersson*[1, 2, 3]).

Mit den modernen ultramikrospektrographischen Methoden kann eine

große Anzahl verschiedener Substanzen in Zellstrukturen an ihrem Ort innerhalb der Zelle bestimmt werden. Die Arbeitsrichtung, über die ich im folgenden kurz referieren will, hat von Anfang an das Ziel direkter *quantitativer* Bestimmungen von möglichst vielen verschiedenen Substanzen in diesem Dimensionsbereich verfolgt.

Die Eigenart des Zellmateriales macht es notwendig, daß jede Meßmethode, die für wirklich quantitative cytochemische Aufgaben in Frage kommt, eine Reihe bestimmter Meßbedingungen erfüllen muß, deren wichtigste folgende sind:

1. Auf Grund der Inhomogenität des Zellaufbaues *müssen Zellelemente von der Größenordnung 1 μ^2 untersucht werden können.* Arbeit bei geringerer Auflösung hat für die allermeisten cytochemischen Probleme auf Grund der großen Fehler, die durch die Inhomogenität der Präparate entstehen, keinen praktischen Wert. Kleinere Meßflächen als 0,1 μ^2 (die leicht im wichtigsten Meßgebiet, dem Ultraviolett, erreicht werden können) haben aus mehreren Gründen keine praktische Bedeutung.

2. Die Meßarbeit selbst und die Präparation für die Messung dürfen dem Objekt nicht so schaden, daß das Meßresultat nicht mehr auf Zellen in natürlichem Zustand übertragbar ist. Dieser Faktor ist von ausschlaggebender Bedeutung für die Konstruktion der Meßapparatur, besonders für den ultravioletten Spektralbereich, und zwingt zur Anwendung äußerst empfindlicher Meßsysteme, relativ langer Meßzeiten und Vorsichtsmaßnahmen verschiedenster Art. Derselbe Faktor bedingt auch die wesentlichen Schwierigkeiten bei der Konstruktion von schnellarbeitenden, voll automatischen Meßapparaturen und seine Bedeutung wird oft unterschätzt.

3. Die Bestimmung soll in jedem speziellen Fall mit ausreichender und bekannter Genauigkeit durchgeführt werden. Dies setzt gewöhnlich voraus: a) bekannte Genauigkeit der Messung (die von dem messenden Instrument abhängig ist), und b) bekannte Genauigkeit der Meßwertanalyse (die von verschiedenen Faktoren abhängig ist).

Im Bereich der quantitativen Cytochemie, die bisher relativ wenig bearbeitet wurde, gibt es große Problemgruppen, die für Untersuchungsmethoden von nur geringer Genauigkeit zugänglich sind. Alle diese Methoden setzen voraus, daß die Effekte, die gemessen werden sollen — z. B. Konzentrations- oder Mengenunterschiede —, groß sind. Es ist jedoch immer eine Voraussetzung für quantitative Arbeit, daß der *Genauigkeitsgrad* der Messung bekannt ist.

4. Das leichtvergängliche Material verlangt, daß die Arbeit so schnell wie möglich durchgeführt wird und, wie die Erfahrung gezeigt hat, von der Person — in der Regel einem Biologen —, die das biologische Material am genauesten kennt und darum am besten beurteilen kann, ob

es während der Messungen geschädigt wird und wie solche Schäden vermieden werden können.

5. Da jede quantitative cytochemische Arbeit auf breiterer Basis die gleichzeitige Ausnutzung verschiedener Verfahren verlangt, muß bei Entwicklung jedes einzelnen Verfahrens die mögliche Koordinierung der Arbeit mit anderen Methoden besonders berücksichtigt werden. Damit sind nicht nur rein spektrographische Methoden gemeint, sondern auch Verfahren zur genauesten Bestimmung der Objektdimensionen, der allgemeinen optischen Eigenschaften des Objektes und der optischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen unter den Meßbedingungen bei biologischem Material und viele andere Momente.

Zur Erfüllung dieser Bedingungen ist natürlich eine große Anzahl von Apparaturen über die einfachen „punktmessenden" Spektrographen hinaus erforderlich, d. h. die vorher schon erwähnten Geräte, mit deren Hilfe der Absorptionsverlauf in einzelnen Meßpunkten des Präparates bestimmt werden kann. Optische Spektrographen für Punktmessungen bis hinunter zum Dimensionsbereich von 0,1 μ^2 sind schon vor 1940 entwickelt worden (*Caspersson*[1, 2]) und wurden in großem Umfange für Untersuchungen von Stoffwechselproblemen der Zelle verwandt (*Caspersson*[3], *Moberger*[23]). Möglichkeiten zur Ausnutzung von Röntgenabsorptionen für Elementaranalysen bei diesen Fragestellungen sind von *Engstrøm*[16] verwirklicht worden, und das Auflösungsvermögen mit Röntgenmethoden wurde von *Lindstrøm*[18—20] über die kritische Grenze von 1 μ hinaus verbessert.

Um die notwendige Geräteentwicklung überblicken und gleichzeitig beurteilen zu können, in welchem Ausmaß hier eine Entwicklungsarbeit begründet ist, soll das für diese Methoden überhaupt in Frage kommende Anwendungsgebiet umrissen werden. Der Dimensionsbereich, in dem die Arbeiten vorgenommen werden müssen, wurde schon erwähnt und ist in Abb. 1 dargestellt. Aus praktischen Gründen ist es zweckmäßig, das Arbeitsgebiet der Ultramikrospektrographie in *direkte* und *indirekte* Methoden zu unterteilen. Mit direkten Methoden ist die Bestimmung der Absorptionskoeffizienten von Strukturen *in situ*, also innerhalb der Zelle, gemeint. *Indirekte* Mikrospektrographie umfaßt die Messung der Absorptionsspektra von Objekten, die mit geeigneten Methoden aus der Zelle isoliert und eventuell in größeren Quantitäten gesammelt worden sind, deren Menge jedoch noch nicht zur Arbeit mit gewöhnlichen spektrographischen Methoden ausreicht. Das Auflösungsvermögen ist darum bei den indirekten Methoden in der Regel weit geringer, aber dafür bieten sie bessere technische Möglichkeiten für die Behandlung mit chemischen Reagenzien, z. B. für die Ultramikrokolorimetrie, und mit Enzymen usw. Die indirekten Methoden erhöhen die Anzahl bearbeitbarer Substanzen erheblich. Theoretisch können solche Reaktionen auch

direkt für die Zellstrukturen mit *direkter* Ultramikrospektroskopie angewandt werden. Praktische Erfahrungen zeigen jedoch, daß die Fehlerquellen bei direkten Messungen solcher Farbreaktionen usw. in der Regel so bedeutend sind, daß sie sich nur selten ausnutzen lassen.

Abb. 3 zeigt den Verlauf der Absorptionskurve für eine 5 μ dicke Schicht eines Homogenates aus Säugetiergewebe. Die dicken horizontalen Linien markieren die bisher mit der im folgenden zu beschreibenden Mikrospektrographieausrüstung ausgenutzten Arbeitsgebiete. Die Skala der Wellenlängen ist logarithmisch und erstreckt sich vom Röntgengebiet bis zum Infrarot. Das Auflösungsvermögen der bisher entwickelten Instrumente ist mit + unter dem Diagramm bezeichnet. ++ bedeutet, daß die Auflösung von 1 μ erreicht werden kann, die das Minimum für die Arbeit an intrazellulären Strukturen darstellt. Im ultravioletten, sichtbaren und infraroten Wellenbereich wird die Auflösungsgrenze von der Wellenlänge des Lichtes bestimmt, da es theoretisch unmöglich ist, mit der nötigen Genauigkeit das Absorptionsspektrum einer Partikel aufzunehmen, die kleiner ist als zwei- bis dreimal λ. Im Röntgenbereich, wo sich die Technik in schneller Entwicklung befindet, ist das Auflösungsvermögen noch durch technische Faktoren begrenzt. Das Schema illustriert, daß eine große Anzahl im Zellmaterial vorkommender organischer Verbindungen selektive Absorptionen im leichtzugänglichen Teil des Ultravioletts bis hinunter zu 2000 Å zeigt, die ausgenutzt werden können. Die besten Beispiele bieten die Nukleinsäuren und die cyklischen Aminosäuren, deren Absorption per Masseneinheit und Konzentration in biologischem Material innerhalb leicht zu bearbeitender Größenordnungen liegt. Diese Tatsache wurde in zahlreichen Untersuchungen über den Nukleotid- und Eiweißumsatz ausgenutzt (*Caspersson*[3] mit Hinweisen). Unter anderen Stoffgruppen von biologischem Interesse mit Absorptionsbanden in diesem Bereich, die in so hohen Konzentrationen vorkommen, daß die resultierenden Absorptionen für die Spektrographie leicht zugänglich sind, können gewisse Sterine, ungesättigte Fettsäuren, Purine, Steroidhormone,

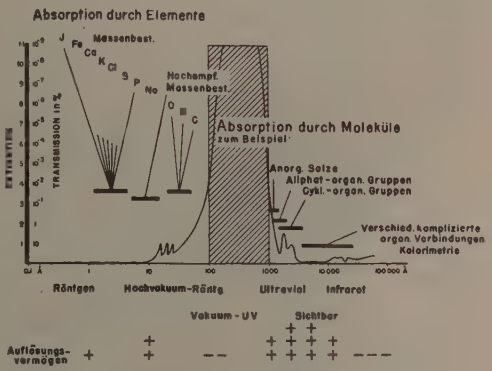


Abb. 3. Übersicht über die Anwendungsbereiche der Ultramikrospektrophotometrie

Adrenalin mit Vorstadien, Thyroxin und verwandte Substanzen, große Gruppen verschiedener Pigmente und Lignin genannt werden. Im langwelligen Ultraviolett und im kurzwelligen Teil des sichtbaren Spektrums liegen die Banden für zahlreiche Stoffe, die mit Chlorophyll und Hämoglobin verwandt sind. Sie zeigen hohe, schmale und daher leicht meßbare Absorptionsbanden. Ebenso liegen die Verhältnisse bei einer Anzahl von Atmungsfermenten und Cofermenten, die aber in der Regel in so kleiner Menge vorkommen, daß spezielle Methoden notwendig sind, um ihre niedrigen Absorptionen messen zu können. Im sichtbaren Spektralbereich zeigen wenige Substanzen ausreichend hohe Absorption, um sich für die routinemäßige Spektrographie zu eignen. Chlorophyll, Hämoglobin und ihre Derivate mögen hier in erster Linie erwähnt werden.

Im infraroten Spektralbereich gibt es eine große Anzahl geeigneter Absorptionsbanden, die ausgenutzt werden können. Leider sind in den meisten Fällen die Wellen des infraroten Lichtes zu lang, und das Auflösungsvermögen ist deshalb für intrazellulare Arbeit unzureichend. Wenn es jedoch nicht darum geht, Zellstrukturen, sondern größere Zellabschnitte und vor allem isolierte Bestandteile aus einer größeren Anzahl von Zellen (indirekte Mikrospektrographie) zu untersuchen, bietet die Infrarotmikrospektrophotometrie außerordentlich gute Arbeitsmöglichkeiten, die im Laufe des Vortrages an Beispielen erläutert werden sollen. Unter 2000 Å nimmt die Absorption organischer Stoffe sehr schnell zu. Die selektiven Absorptionen in diesem Bereich werden in erster Linie durch Atomkonfigurationen verursacht, die für biologische Untersuchungen des Zellstoffwechsels von relativ begrenztem Interesse sein dürften. Außerdem nehmen gewisse Meßfehler auf Grund des steigenden Brechungsindex im Material stark zu und dies erschwert die Deutung der Absorptionskurven. Dieser Bereich ist in Abb. 3 schraffiert dargestellt. Auf der kurzwelligen Seite dieses Wellengebietes findet man Absorptionsdiskontinuitäten, die für ultramikrospektrographische Zwecke ausgenutzt werden können. Sie werden durch Elektronensprünge in den inneren Elektronenbahnen bedingt und können für praktische cytochemische Arbeit angewandt werden.

Welche der in Abb. 3 demonstrierten Arbeitsmöglichkeiten realisiert werden können, ist von der Konstruktion von Apparaten abhängig, die innerhalb der verschiedenen Wellenbereiche die vorher genannten *Meßbedingungen erfüllen*. Es ist offenbar, daß bei einer Ausrüstung, die alle diese Möglichkeiten auszunutzen sucht, die einfachen, direkt punktmessenden Ultramikrospektrographen nur einen kleineren Teil ausmachen.

Praktische Möglichkeiten zur Erfüllung der Meßbedingungen

Die erste der im vorigen Abschnitt genannten Meßbedingungen wird im optischen Gebiet mit größter Leichtigkeit im sichtbaren Bereich

erfüllt, wo ausreichende Lichtquellen zur Verfügung stehen und die Objekte in der Regel große Bestrahlungsdosen aushalten. Diese Fakta machen die Konstruktion von Spektrographen für diesen Bereich relativ leicht. Die Anzahl der in diesen Wellenlängen absorbierenden Stoffe ist jedoch so außerordentlich gering, daß dieser Spektralabschnitt nur sehr begrenzte Bedeutung für biologische Probleme hat. Auf die Unzuverlässigkeit der Färbemethoden wurde schon hingewiesen. Im Ultraviolett jedoch liegen die Absorptionsbanden einer großen Menge biologisch wichtiger Substanzen. Hier erscheinen die technischen Probleme in einer ganz anderen Größenordnung als im sichtbaren Gebiet. Übliche Refraktionsoptik läßt das Arbeiten bis hinunter zu 2000 Å zu, und der erstrebte Dimensionsbereich von 0,1 μ ist für Routinearbeit erreichbar, vorausgesetzt, daß dem Objekt nicht durch Überstrahlung geschadet wird (Meßbedingung 2). Das Vermeiden von Überbestrahlung des Objektes zusammen mit der Forderung, die Auflösung absehbar über 1 μ zu steigern, bildet das Zentralproblem bei der Konstruktion jedes für biologische Zwecke anwendbaren Spektrographen. Die Arbeit mit niedriger Auflösung und mit großen Lichtintensitäten ist dagegen im Ultraviolett beinahe ebenso einfach wie im sichtbaren Wellenbereich, ihr fehlt aber für cytochemische Fragestellungen von größerer Reichweite jede Bedeutung. Im Röntgengebiet erlauben Kontaktmikroradiogramme, die bisher die besten Resultate ergeben haben, eine bessere Auflösung als 1 μ (*Lindström*[19]). Eine weitere Verbesserung des Auflösungsvermögens in diesem Bereich kann innerhalb der nächsten Jahre erwartet werden. Diese Technik hat jedoch den Nachteil, daß die Präparate in den meisten Fällen im Vakuum bearbeitet werden müssen.

Meßbedingung 2: Im allgemeinen setzt die Vorbehandlung von Präparaten für gewöhnliche spektrographische Arbeit eine umständliche Technik voraus, wenn der meßfähige Zustand der Objekte den Verhältnissen im lebenden Material annähernd vergleichbar sein soll. Prinzipiell sind diese Schwierigkeiten in den meisten Fällen überwindbar.

Meßbedingung 3: Um eine Bestimmung mit ausreichender und bekannter Genauigkeit durchführen zu können, ist es zunächst erforderlich, daß die Messung selbst im Spektrographen mit bestimmter Genauigkeit stattfindet und daß weiterhin die Meßwerte mit bekannter Genauigkeit analysiert werden. Das erste Moment wird vom Meßinstrument als solchem bestimmt, das andere setzt folgende weitere Bedingungen voraus:

α) Die optischen Eigenschaften des einzelnen Meßobjektes müssen bekannt sein,

β) der Einfluß einer Reihe spezieller Meßfehler — in erster Linie Fehler durch Lichtbrechung und -streuung — müssen kontrollierbar sein.

γ) Das Objekt muß eine Anzahl recht komplexer Bedingungen optischen Charakters erfüllen und

δ) die optischen Konstanten für die verschiedenen zu messenden Substanzen müssen unter den Verhältnissen bekannt sein, wie sie im Objekt während der Messung herrschen. Die obengenannten punktmessenden Spektrographen erfüllen die Bedingungen α und β, zeigen aber bestimmte Einschränkungen für γ und δ beim Arbeiten im wichtigsten Spektralbereich, dem mittleren Ultraviolett. Für allgemeinere spektrographische Methoden ist es notwendig, als Komplement eine Reihe spezieller Verfahren zu entwickeln, auf die im nächsten Abschnitt hingewiesen wird.

Meßbedingung 4 ist besonders wichtig für die praktische Konstruktion des Meßinstrumentariums.

Meßbedingung 5 verlangt die Entwicklung einer großen Anzahl verschiedener Hilfsmethoden. Die meisten sind im Hauptteil unter dem Abschnitt „Praktischer Ausbau der einzelnen Verfahren" beschrieben. Eine dieser Hilfsmethoden aber muß hier auf Grund ihrer Bedeutung besonders behandelt werden: Die Ausführung absuchender Messungen.

Absuchende Messungen

(multiple Linienabsuchung und Absuchen einer Fläche)

Erfahrungen aus der praktischen Mikrospektrographie in größerer Skala haben gezeigt, daß biologische Probleme im allgemeinen zwei Arten von Meßverfahren verlangen: die schon genannte „*Punktmessung*" und die „Flächenmessung" oder „*absuchende Messung*". Diese letzte Bezeichnung soll im weiteren vorgezogen werden. Die Punktmessung gibt Aufschluß über die stoffliche Zusammensetzung eines sehr kleinen Objektausschnittes. Die biochemische Fragestellung verlangt aber oft Bestimmung der Totalmenge einer bestimmten absorbierenden Substanz innerhalb eines bestimmten optischen Querschnittes im Präparat, z. B. einer ganzen Zelle oder eines Zellkernes. Die Technik der Punktmessung würde eine außerordentlich hohe Anzahl einzelner Messungen auf Grund der Inhomogenität des biologischen Objektes erfordern. Man findet jedoch oft, daß der Verlauf der Absorptionsspektren, etwa im mittleren Ultraviolett, innerhalb größerer Zellabschnitte oder für einen ganzen Zellkörper für die verschiedenen Meßpunkte gleich ist. Das bedeutet, daß die prozentuale Zusammensetzung des Objektes in seinen verschiedenen Teilen gleich sein muß, wenn auch die Höhe der Absorptionskurven selbst in praktisch allen Objekten außerordentlich variiert und damit den Inhomogenitätsgrad biologischen Materials widerspiegelt. Die Gleichheit der prozentualen stofflichen Zusammensetzung innerhalb größerer Teile des Objektes ermöglicht eine bedeutende Arbeitsvereinfachung durch die Automatisierung der Messungen. Aus diesem Grunde wurden automatische absuchende Spektrographen entwickelt, die alle die hohe Auflösung

von 1 bis 0,1 μ^2 zulassen, die das biologische Material erfordert (*Caspersson* und Mitarb.[4–15]). Sie analysieren einzelne Absuchstrecken, die in wahlfreiem Abstand über das ganze Präparat gelegt werden können (multiple

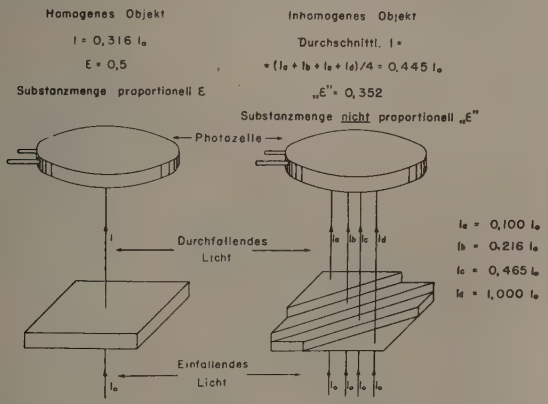


Abb. 4 a

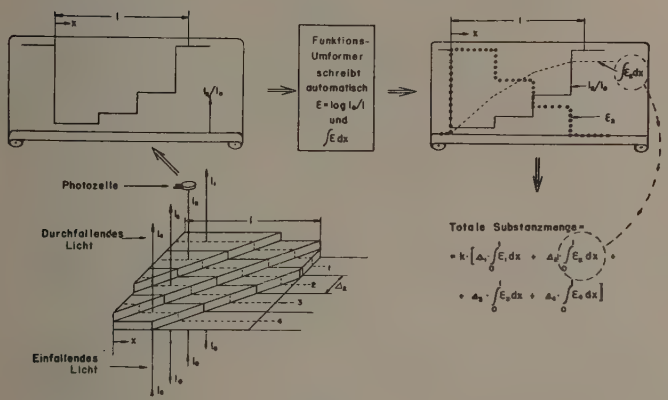


Abb. 4 b

Abb. 4. Messung am inhomogenen Objekt. a) Fehler, die beim Messen mit zu weiter Photozellenöffnung (zu geringes Auflösungsvermögen) entstehen; b) Vermeidung dieser Fehler durch enge Photozellenöffnung und absuchendes Meßverfahren

Linienabsuchung) oder sie messen eine ganze Objektoberfläche automatisch (automatische Flächenabsuchung). Der Zeitgewinn durch die automatischen Methoden ist außerordentlich groß und das ist für das empfindliche biologische Material von ausschlaggebender Bedeutung. So mußte z. B. früher für eine einzelne gewöhnliche Säugetierzelle zur Totalbestimmung ihres Inhaltes mit der Punktmessungsmethode eine Arbeits-

zeit von mehreren Tagen aufgewendet werden. Da außerdem in der Regel meist eine große Anzahl von Zellen in einem Präparat untersucht werden muß, ist es offensichtlich, daß mit der automatischen Messung einer der wesentlichsten Faktoren ausgeschaltet werden konnte, der früher die generellen Analysenmöglichkeiten der Ultramikrospektrographie für biologisches Material praktisch eingeschränkt hat.

Abb. 4 zeigt, daß es für die Totalmengenbestimmung keinen anderen Weg gibt, als eine sehr große Anzahl von Messungen mit höchster Auflösung, d. h. mit sehr kleiner Meßfläche, auszuführen. Sie weist ebenfalls auf die Größenordnung der Meßfehler hin, die entstehen, wenn das Auflösungsvermögen der Einzelmessung nicht ausreicht und wenn der Objektausschnitt, der in die Photozelle projiziert wird, inhomogen ist. Die gewählten Zahlen entsprechen den Verhältnissen in durchschnittlichem Säugetiermaterial und der Fehler von 30% dürfte schon oft bei Meßflächen mit dem Durchmesser von 2 bis 3 μ in 5 μ dicken Schnitten überschritten werden.

Zwei absuchende Ultramikrospektrographmodelle sind an unserem Institut gebaut worden. Das eine ist besonders für biologische Routinearbeit in großer Skala bestimmt und für das Absuchen von Meßstrecken konstruiert, die wahlfrei durch das Objekt gelegt werden können. Die Registrierung und die Umformung der Transmissionswerte geschieht in einem besonderen Funktionsumformer, der direkt die Totalextinktion längs der abgesuchten Linien angibt. Ein anderes universell anwendbares Spektrographmodell hat außer dieser Anordnung die Einrichtung zur direkten Aufzeichnung der Totalextinktion einer ganzen Fläche. Die Wahl dieser beiden absuchenden Spektrographtypen beruht auf dem Vorkommen von zwei verschiedenen Objektarten bei biologischen Untersuchungen. Die gewöhnlichste wurde in Abb. 5a dargestellt und ist eine Zelle mit unregelmäßiger Kontur, umgeben von Material, das nicht mitgemessen werden soll. Für diesen Objekttyp ist die multiple Linienabsuchung die schnellste Arbeitsweise. Für die selteneren Fälle von Messungen an einem freiliegenden Objekt, z. B. Totalnukleotidbestimmung in freipräparierten Zellen, kann viel Zeit dadurch gewonnen werden, daß die Apparatur direkt eine große Anzahl einzelner Absuchstrecken summiert, die von vornherein in bestimmtem Abstand voneinander angelegt wurden (Abb. 5b). Der von uns[15] beschriebene Spektrograph ist mit einer solchen Anordnung ausgerüstet und das Routinemodell kann ebenfalls mit dieser Einrichtung versehen werden.

Praktischer Ausbau der Instrumentierung für allgemeine quantitative cytochemische Arbeit auf mikrospektrographischer Grundlage

Die Inhomogenität biologischen Materials verlangt die Konstruktion besonders geeigneter Apparaturen für Punktmessung und automatische

Messung, um die Möglichkeiten der *direkten* Mikrospektrographie für quantitative cytochemische Arbeit auch auf einer allgemeineren Basis für Routineuntersuchungen ausnutzen zu können. Diese Apparate müssen die obenangeführten zentralen Meßbedingungen erfüllen: Die Messung

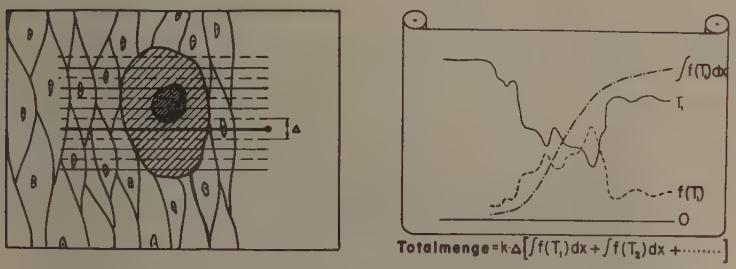


Abb. 5 a

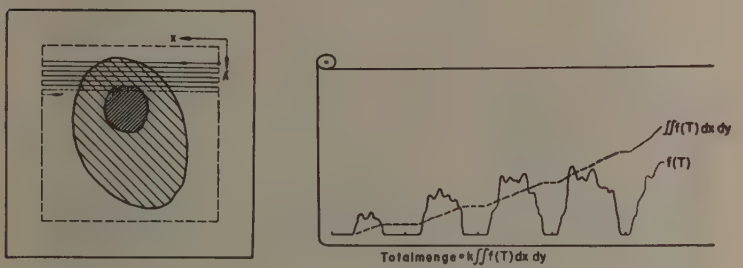


Abb. 5 b

Abb. 5 a und 5 b. Die beiden typischen Objektarten, die für absuchende Messung in Frage kommen. a) Der gewöhnlichste Typ, der besonders für multiple Linienabsuchung geeignet ist. b) Freiliegendes Objekt auf nicht absorbierendem Hintergrund, das mit dem Flächenabsuchverfahren gemessen werden kann

muß mit einer höheren Auflösung als 1 μ und mit bekannter Genauigkeit vorgenommen werden, ohne dem Objekt durch Überbestrahlung zu schaden, und das Gerät muß einfach, schnell und leicht zu handhaben sein. Außerdem ist eine Reihe von *Hilfsmethoden* erforderlich. Die wichtigsten haben folgende Aufgaben: Vorbehandlung des Objektes auf solche Weise, daß seine optischen Eigenschaften nach der Behandlung so weit bekannt sind, daß die in einem Ultramikrospektrographen mit bekannten optischen Eigenschaften erhaltenen Meßwerte mit dem gewünschten Genauigkeitsgrad analysiert werden können. Zu dieser Methodengruppe gehören u. a. auch Verfahren für mechanische Isolierung, Mikrodissektion, Ultrazentrifugierung usw. sowie die Methode, in unmittelbarer Nähe des

Meßobjektes ein „Freigebiet" herauszupräparieren, um so einen ausreichend genauen Wert für die einfallende Lichtintensität zu bekommen. Ferner sind Verfahren erforderlich, die Dicke von Mikrotomschnitten zu bestimmen und zu kontrollieren, sowie die exakten Dimensionen des Objektes festzulegen. Die Notwendigkeit, mit dem gleichen Objekt in verschiedenen Wellenbereichen zu arbeiten, verlangt weitere spezielle Hilfsmethoden. In diesem Fall muß man nämlich bestimmte Punkte im gleichen Objekt bei wiederholten Messungen wiederfinden können. Um die gemessenen Kurven schließlich in ihre einzelnen Komponenten zerlegen zu können, müssen sich die optischen Eigenschaften des Meßobjektes für die Arbeit mit praktisch erreichbaren Mikrospektrographaperturen eignen und die optischen Eigenschaften der beteiligten Substanzen müssen unter reellen Meßbedingungen bekannt sein.

Das Zentralinstrument: Der optische Universalmikrospektrograph

Das absuchende Meßverfahren setzt einen beträchtlichen Apparateeinsatz voraus, wenn gleichzeitig die Forderungen für hohe Auflösung und ein Minimum von Objektbestrahlung erfüllt werden sollen. Um

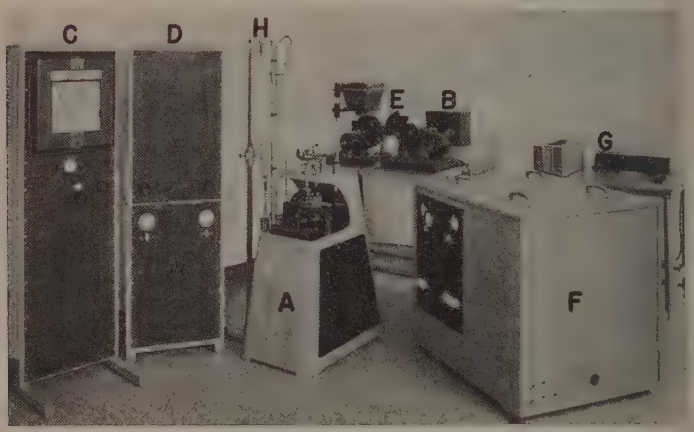


Abb. 6. Aufstellungsbild des Universalultramikrospektrographen

Doppelinstallierung teurer Apparaturteile zu vermeiden, wurde konstruktiv so vorgegangen, daß in einem Zentralinstrument — *dem Universalmikrospektrographen für Routinearbeiten* — die meisten kostspieligen Details in einer Einheit gesammelt wurden, so daß sie für mehrere verschiedene Arbeitstypen ausgenutzt werden können. Der Universalmikrospektrograph ist nach einem „Baukastensystem" in der Art konstruiert, daß verschiedene Anordnungen als Zusatzteile eingebaut werden können, wie

z. B. die Ausrüstung für Dichroismusmessungen, für die Messung von Modellsubstanzen im Gültigkeitsbereich des *Lambert-Beer*schen Gesetzes, die Anordnung für die Registrierung der Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge, für die Messung in ultramikrokolorimetrischen Küvetten und die Einrichtung für die elektronische Analyse der Meßwerte.

Das hohe Auflösungsvermögen und die Forderung eines äußerst kleinen Meßpunktes zwingen zur Anwendung von Lichtquellen mit höchstmöglicher spezifischer Lichtstärke und zu einem photoelektrischen Meßgerät mit höchster erreichbarer Empfindlichkeit. Die Forderung, daß sowohl beim absuchenden Meßverfahren wie auch bei Punktmessungen unbedingt die *gleichen* Orte im Objekt mehrere Male hintereinander getroffen werden müssen (z. B. bei Anwendung mehrerer Wellenlängen) bedingt, daß die Objektverschiebung mit einer Reproduzierbarkeit innerhalb der Größenordnung 0,1 μ vorgenommen werden muß. Dies setzt spezielle und mit besonderer Präzision hergestellte mechanische Anordnungen voraus.

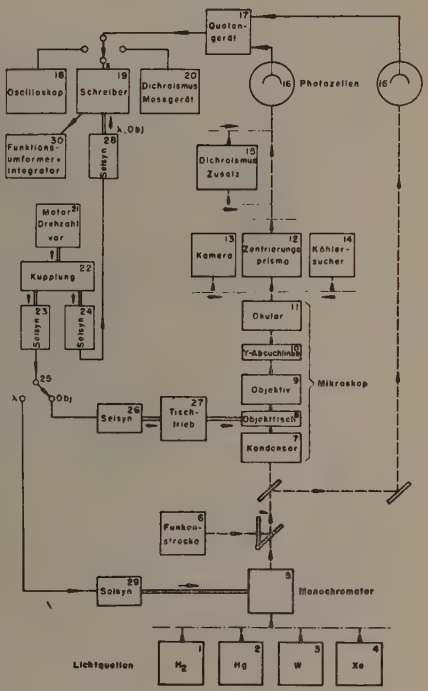


Abb. 7. Blockdiagramm für den Universalmikrospektrographen

Der Aufbau des Gerätes geht aus den Abb. 6 und 7 hervor. In der Beschreibung des folgenden Abschnittes weisen die Buchstaben auf Abb. 6 und die Zahlen auf Abb. 7 hin. Der optische Zentralteil ist in einem außerordentlich stabilen Gußeisenstativ (A) angeordnet, das einen Monochromator (5) mit auswechselbaren Lichtquellen (1 bis 4) in seinem unteren Teil enthält. Im Mittelteil befindet sich die leicht austauschbare Mikroskop- oder Interferenzoptik, sowie die Anordnung für die Verschiebung des Meßobjektes (26, 27). Der obere Teil des Gußeisenstativs enthält die Zentrierungsanordnung für den Meßstrahl (12). Von A gehen Meß- und Vergleichsstrahl zu den Photozellen im Photozellengehäuse B. Der elektronische Teil der Meßapparatur ist im Stativ C gesammelt, wo fortlaufend die Lichtintensität durch das Registrierinstrument (19)

aufgezeichnet wird. Bei Punktmessungen dient ein spezialkonstruiertes Oscilloskop (18) als Ausgleichsindikator. Während der Messung wird das Objekt mit Hilfe eines Motors (21) mit frei bestimmbarer Geschwindigkeit durch Hebelbedienung des Beobachters hin und zurück bewegt. Mechanisch wäre es einfacher, während der Messung Teile des optischen Systemes zu bewegen, d. h. das Bild des Objektes an Stelle des Objektes selbst. Aus verschiedenen Gründen (es muß auf die einschlägige Literatur verwiesen werden) wird mit beweglichem Objekt im Ultraviolett eine höhere Meßgenauigkeit erzielt.

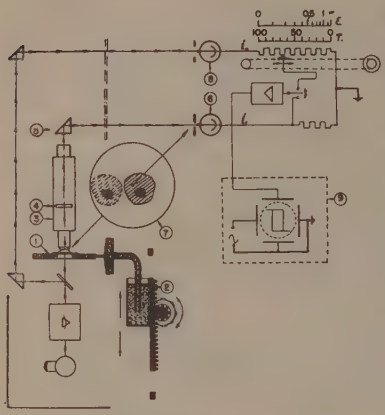


Abb. 8a

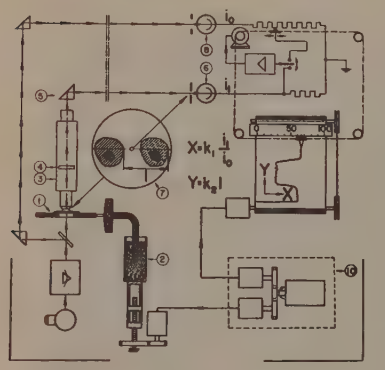


Abb. 8b

Abb. 8. a) Prinzip der Punktmessung; b) Prinzip der absuchenden Messung mit dem Universalmikrospektrographen. *1)* Objekt, *2)* Verschiebungsanordnung für das Objekt längs der X-Achse, *3)* und *5)* Mikroskopoptik, *4)* Anordnung für die Verschiebung der Absuchstrecken längs der Y-Achse, *6)* und *8)* Multiplikatoren, *7)* Gesichtsfeld im Mikroskop, *9)* Oscilloskop, Ausgleichsindikator bei Punktmessungen *10)* Motor mit Vor- und Rückwärtstrieb und Servossystem für absuchende Messungen

Abb. 8a und b zeigen die prinzipiellen Anordnungen bei beiden Meßverfahren.

Mit diesem Instrumentarium können sowohl Punkt- und absuchende Messungen wie auch die automatische Registrierung des Absorptionsverlaufes in einem bestimmten Wellenbereich für einen bestimmten Objektabschnitt erreicht werden. Da Lichtquellen und Optik leicht austauschbar sind, umfaßt die Apparatur das Gebiet der Wellenlängen von 2000 Å bis zum kurzwelligen Infrarot, und die Arbeit kann in jedem einzelnen Fall mit der höchsten Auflösung durchgeführt werden, die praktisch für Optik innerhalb dieses Spektralgebietes erreichbar ist. Außer für direkte Mikrospektrographie biologischer Objekte eignet sich dieses Gerät auch für Messungen an Mikroradiogrammen der Röntgenspektrographen nach der gleichen Norm, wie sie für Messung biologischen Materials gültig ist. Interferenzoptik läßt sich ebenfalls unmittelbar einschalten, so daß absuchende inter-

ferenzmikrophotometrische Bestimmungen durchgeführt werden können[11]. Direkt an das Instrument kann ein Meßwertanalysator, d. h. ein Funktionsumformer mit Integrator, angeschlossen werden (siehe unten).

Trotz des „Baukastensystems" erfüllt diese Konstruktion des Universalmikrospektrographen in vielen Einzelheiten die Bedürfnisse der biochemischen Routinearbeit in Bezug auf Stabilität und Bequemlichkeit auf breiter Grundlage. Das Gußeisenstativ *A* wie auch andere Teile des Gerätes sind speziell zum Schutz empfindlicher Details vor mechanischer und thermischer Beanspruchung gebaut. Die Forderung nach Stabilität gegen solche Einwirkungen ist besonders hoch. Die gewählte Konstruktion hat sich in jahrelanger harter Routinearbeit sehr gut bewährt. Andererseits bringt diese Bauweise es mit sich, daß die Apparatur für Entwicklungsarbeit und für gewisse Arten von Spezialmessungen, die seltener im Rahmen biologischer Arbeitsaufgaben vorkommen, weniger geeignet ist. Aus diesem Grunde wurde im Institut ein leicht umzubauender Universalmikrospektrograph[15] entwickelt, der im großen und ganzen nach den gleichen Richtlinien konstruiert wurde, dessen Teile aber alle austauschbar und so leicht wie möglich zugänglich sind. Mit diesem Spektrographen können noch weitere Arbeitstypen, in gewissen Fällen mit noch höherer Präzision, durchgeführt werden. Er stellt aber auch höhere Ansprüche an die Geschicklichkeit der Bedienung.

Ein *Diagramm* zeigt die gesamte Apparategruppe, wie sie am Institut entwickelt und zusammengestellt wurde, um eine Unterlage für allgemeinere cytochemische Arbeitsmethodik zu schaffen. Die einzelnen Verfahren sind der Einfachheit halber in der gewöhnlichen Reihenfolge einer cytochemischen Untersuchung angeordnet und in zwei Gruppen eingeteilt, die teils allgemeine Laboratoriumsmethoden, teils spezielle, für cytochemische Analysen neu ausgearbeitete oder modifizierte Apparate und Verfahren umfassen. Die weitere Darstellung folgt der Aufstellung im Diagramm.

1. Untersuchung des lebenden Objektes

Lebendes Material wird zunächst mit den üblichen lichtoptischen, UV-mikroskopischen und interferenzoptischen (z. B. Phasenkontrast-) Verfahren untersucht. Es ist im allgemeinen jedoch zwecklos, spektrographische oder interferenzmikrophotometrische *Meßarbeit* an lebenden Objekten vorzunehmen, und zwar wegen der starken Lichtstreuung und der intraplasmatischen Bewegungen und vor allem wegen der Tatsache, daß einzelne Zellorganellen in lebendem Material zumeist nicht von der Umgebung freizupräparieren sind. Andererseits ist es für optische Mikrospektroskopiearbeit gelegentlich vorteilhaft, wenn nach der Messung an fixiertem Material die Absorptionsverteilung bei einzelnen Wellen-

Übersicht über die Ultramikrospektrographie.

Verfahren	Instrumente Allgemeine
1. Untersuchung des lebenden Objektes.	Übliche lichtoptische Methoden. UV-Mikroskopie. Phasenkontrast.
2. Dimensionsbestimmung des Objektes.	Übliche lichtoptische Methoden. Interferometrische Bestimmung der Präparatdicke.
3. Präparation des Objektes.	Übliche histologische Methoden. Mikromanipulation.
4. Bestimmung des Trockengewichtes („Masse")	Interferenzmikroskopische Punktmessungen.
5. Bestimmung biologisch wichtiger Elemente.	
6. Bestimmung von Molekülen in situ, die im optischen Spektralbereich absorbieren. (Direkte Mikrospektrographie.)	Infrarotspektrographie in Mikroskala (bei ausreichender Auflösung).
7. Bestimmung von Substanzen nach bes. Vorbehandlung. (Isolierung, Extraktion oder Kolorimetrie in Ultramikroskala.) (Indirekte Mikrospektrographie.)	Infrarotspektrographie in Mikroskala.
8. Kontrolle gewisser Objekteigenschaften.	
9. Messung der optischen Eigenschaften aktueller Substanzen.	
10. Meßwertanalyse.	

ausrüstung für quantitative Cytochemie

und Methoden

Speziell entwickelte oder modifizierte

Instrument-kombinationen

Photographische UV-Mikrospektrophotometer.

Mikroplanimeter. Bestimmte Methoden der Präparatdickenbestimmung.

Gefriertrocknungsapparatur. Methoden zur Kontrolle der Mikrotomschnitte.

Hochvakuum-Röntgenspektrograph zur Trockengewichtsbestimmung.

Absuchendes Interferenzmikrophotometer.

Röntgenspektrograph zur Elementaranalyse.

Universal-Mikrospektrograph für optische Mikrospektrographie.

- 2000—2500 Å
- 2480—3300 Å
- 3300—Infrarot
- Dichroismusmessungen
- Verschiedene Transmissionsbereiche
- Verschiedene Genauigkeitsmessungen
- Verschiedene Meßflächen, herunter bis zur Auflösungsgrenze
- Indirekte Mikrospektrogr.
- Ultramikrokolorimetrie in Küvetten
- Ultramikrokolorimetrie in kleinen Tropfen

Punktmessungen

Absuchende Messungen

Instrument für registrierende Messungen der Lichtverteilung um das Objekt.

„Linsenküvette." Refraktometer für Modellsubstanzen in Ultramikroskala.

Extinktionskalkulator mit Integrator.

Allgemeiner Funktionsumformer mit Integrator.

längen in entsprechenden lebenden Zellen verglichen wird. Hierfür ist die photographische UV-Mikrospektrophotometrie aus verschiedenen technischen Gründen besonders geeignet und ihre begrenzte Genauigkeit in diesem Rahmen von untergeordneter Bedeutung.

2. Dimensionsbestimmung des Objektes

Die Bestimmung von optischen Querschnitten kann an größeren Objekten mit gewöhnlichen photographischen oder projektionsplanimetrischen Verfahren gemacht werden. Für das Studium der endonuklearen Strukturen, die eine große Rolle bei Wachstumsprozessen spielen, mußten besondere Meßmethoden geschaffen werden. In der Aufstellung ist ein spezielles Mikroplanimeter angeführt, das Serienmessungen bis hinunter zur Auflösungsgrenze des optischen Mikroskops erläubt[12]. Der Apparat kann so angewandt werden, daß er gleichzeitige Messungen größerer Serien von beispielsweise Nukleolen, Kernen und Cytoplasmen derselben Zellpopulation zusammenfaßt. Die Bestimmung der Objektdicke hat bei den meisten Arbeitstypen keine größere praktische Bedeutung. Der Abstand zwischen Objektträger und Deckglas kann bei Schnittpräparaten leicht bestimmt werden, aber die gewöhnliche Schnittdicke biologischen Materials hat wenig mit dem Abstand zwischen Deckglas und Objektträger gemeinsam. In der Regel sind die Präparate ungleich, Ober- und Unterseiten nach Herauslösen des Einbettungsmittels ausgesprochen uneben, und daher fehlt der Messung des Abstandes zwischen Ober- und Unterseite eines Schnittes meist jeder praktische Wert.

3. Die Vorbehandlung des Objektes

geschieht nach verschiedenen Verfahren für verschiedene Zwecke. Für die Arbeit im optischen Gebiet spielt die Gefriertrocknungsmethode eine bedeutende Rolle. Ein großer Teil der bisher durchgeführten ultraviolettmikrospektrographischen Arbeit hat die Tatsache ausgenutzt, daß bei gefriergetrockneten Präparaten nach Glycerineinbettung die Lichtverluste durch Brechung und Streuung außerordentlich gering gehalten werden können (*Caspersson* 1940, Einzelheiten vgl. [3]). Die Anforderungen an die Qualität von Gefriertrocknungsapparaturen sind sehr hoch. Die besten Resultate wurden mit einer Modifikation des Glick-Malmstrøm-Gerätes[24] erzielt. Eine Fehlerquelle von sehr großer Bedeutung ist die Schrumpfung des Objektes durch Fixierung, die bei den meisten Fixierungsmitteln bis zu 50 Vol.-% ausmachen kann. Sehr häufig findet man in Zellen verschiedener Funktionszustände nach der chemischen Fixierung völlig verschiedenartige Schrumpfungszustände. Der gewöhnlichste Weg, dieser Schwierigkeit zu begegnen, besteht darin, nach Möglichkeit nicht die Konzentrationen der absorbierenden Stoffe, sondern

die Totalmenge absorbierender Substanzen pro Zelle, d. h. pro metabolische Einheit, zu vergleichen. Dies setzt unter anderem voraus, rasche absuchende Messungen durchführen zu können. Die Fixierungsschrumpfung ist einer der wesentlichsten Gründe für die Schaffung der vorher besprochenen absuchenden Meßapparatur. Für eine Totalbestimmung können mehrere Mikrotomschnitte durch eine einzelne Zelle geführt und dann kann die Gesamtmenge absorbierender Substanz für jeden Schnitt einzeln gemessen werden. In der Regel ist es jedoch bequemer, einzelne Zellen mittels besonderer Methoden von ihrer Umgebung zu isolieren und die Totalmenge in einem Arbeitsgang zu bestimmen. Unter den Vorbereitungsmethoden spielen darum nunmehr die Verfahren zur Isolierung einzelner Zellen eine immer größere Rolle. Bisher wurden hauptsächlich für diesen Zweck mechanische Methoden, wie Mikrodissektion und Ultrazentrifugierung, angewandt, während neuerdings auch chemische Verfahren, darunter besonders enzymatische Isolierung, an Bedeutung gewinnen.

4. Trockengewichtsbestimmung

Die Absorption von Röntgenstrahlen eines geeigneten Wellengebietes kann für eine Trockengewichtsbestimmung gewöhnlichen biologischen Materials ausgenutzt werden (*Engstrøm* und *Lindstrøm*[17]). Die Radiogramme, die nach dieser Methode aufgenommen worden sind, können direkt absuchend im Universalmikrospektrographen gemessen werden, der hierfür mit einer Ausrüstung für sichtbares Licht versehen wurde. Der Meßwertanalysator kann so eingestellt werden, daß gleichzeitig mit der Messung die Trockengewichtsmenge des Objektes aufgezeichnet wird.

Ein anderer Weg zur Trockengewichtsbestimmung geht über die Interferenzmikrophotometrie. Die Bestimmung der Weglänge des Lichtes im Interferenzmikroskop ist von *Davies* et al. zur Trockensubstanzbestimmung verwendet worden. Die Ermittlung des Trockengewichtes eines größeren Objektabschnittes, z. B. in einer einzelnen Zelle, erfordert absuchende Verfahren, die denen der Absorptionsmessungen entsprechen. Eine solche Interferenzmikrophotometrie ist direkt im Universalmikrospektrographen nach Einsetzen von Interferenzoptik durchführbar. Der unten beschriebene Meßwertanalysator kann auch in diesem Fall die Meßwerte direkt in Trockensubstanzwerte transformieren und sie in einem Arbeitsgang während der Messung registrieren. Die Röntgen- und die Interferenzmethode ergänzen einander. Das Röntgenverfahren ist innerhalb einer viel größeren Mengenskala genauer und unabhängig von der Vorbehandlung des Objektes. Die Interferenzmethode andererseits ist sehr empfindlich gegen die Vorbehandlung des Objektes, zeigt aber den erheblichen Vorteil, daß das Präparat vor der Messung nicht dehydriert zu werden braucht.

5. Bestimmung von Elementen

Mikroradiogramme zur Elementaranalyse, die nach *Engstrøms* Methode aufgenommen worden sind, können auf gleiche Art im Universalmikrospektrographen bearbeitet werden, wie dies für die Trockengewichtsbestimmung beschrieben worden ist.

6. Bestimmung von Absorptionen im optischen Spektralbereich

Diese Messungen lassen sich im Universalmikrospektrographen mit der vorher beschriebenen Grundausrüstung direkt durchführen. Das Schema enthält außerdem eine Anzahl verschiedener Zusatzteile für spezielle Anwendungsgebiete, die hier nicht näher behandelt werden sollen.

7. Ultramikrokolorimetrische Messungen

Dieses Gebiet hat sich bisher nur in begrenztem Maße auf biologische Problemstellungen direkt anwenden lassen. Die Apparatur eignet sich jedoch für die Bewertung kolorimetrischer Reaktionen in der Ultramikroskala.

8. Kontrolle gewisser Objekteigenschaften

Um eine Absorptionsmessung im optischen Gebiet durchführen zu können, müssen die optischen Eigenschaften des beleuchteten Meßobjektes im allgemeinen bekannt sein. Besonders wichtig ist die Kontrolle, ob die Apertur des benutzten Meßgerätes für die spezielle Messung ausreicht, sowie die Vergewisserung, daß keine Lichtverluste durch Reflexion im Objekt auftreten. Für diese Kontrollen wurden besondere Geräte entwickelt, die an den Ultramikrospektrographen angeschlossen werden können.

9. Bestimmung der optischen Eigenschaften von Meßsubstanzen

In der Literatur findet man nur selten Angaben über die Gültigkeit des *Lambert-Beer*schen Gesetzes für so hohe Konzentrationen, wie sie im Zellmaterial vorkommen. Für jede besondere Substanz, die untersucht werden soll, müssen daher solche Messungen im voraus gemacht werden. Diese Messungen stoßen auf beträchtliche technische Schwierigkeiten, weil die Bestimmung in Küvetten mit Volumina von nur einigen μ^3 mit oft sehr hoch viskosen Lösungen durchgeführt werden müssen. Eine besondere Zusatzanordnung in Form einer Linsenküvette (*Svensson*[27]) wurde zu diesem Zwecke für das Universalmikrospektrophotometer entwickelt. Bei den hohen Extinktionen und großen Substanzkonzentrationen, wie sie in bestimmten Fällen besonders in Zellkernen vorkommen, besteht die Gefahr, daß anomale Dispersion als Fehlerquelle auftritt. Methoden für die Messung der Brechungsindices hoch absorbierender

Substanzen wurden von *Svensson* besonders im Hinblick auf Stoffe, die für die Spektrographie von Bedeutung sind, ausgearbeitet.

10. Automatischer Meßwertanalysator, selbstregistrierender Funktionsumformer mit Integrator (Lomakka[21, 22])

Dieses Instrument kann direkt an den Universalmikrospektrographen angeschlossen werden. Es ist aber auch so ausgeführt, daß es beliebig vom Spektrographen losgekoppelt und zur Analyse schon registrierter Transmissionskurven benutzt werden kann (Abb. 9). Bei der Konstruktion des Apparates wurden die Forderungen der biologischen Routinearbeit nach Auswertungsmöglichkeit großer Versuchsserien weitgehend berücksichtigt. Das Gerät ermöglicht die Umformung gegebener Transmissionswerte für jede beliebige Funktion und kann

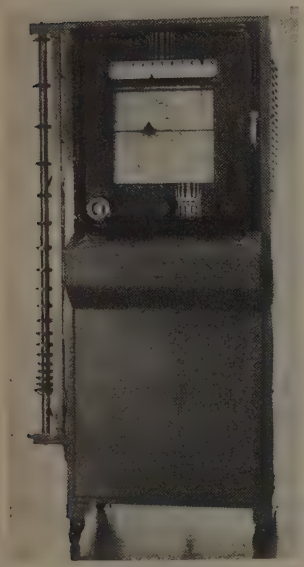


Abb. 9 a

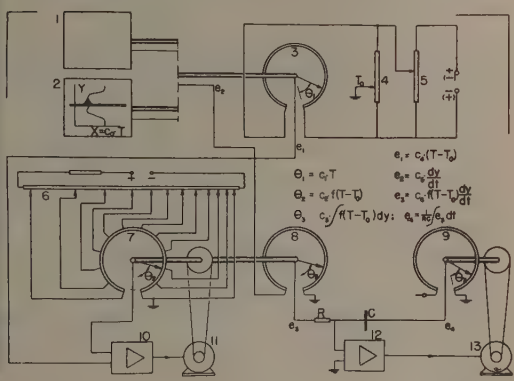


Abb. 9 b

Abb. 9. Funktionsumformer mit Integrator. a) Aufstellungsbild; b) Kopplungsschema. *1)* und *2)* stellen die beiden verschiedenen Arbeitsmethoden dar: *1)* Direkter Anschluß an den Mikrospektrographen (der auch als Plattenphotometer oder Interferenzmikrophotometer dient) und *2)* Analyse einer vorher registrierten Kurve. *3), 4), 5), 6), 7), 8), 10)* und *11)* Funktionsumformungsgerät. Die umzuformende Funktion wird bei *6), 9)* und *12)* eingestellt. *13)* Integrierungsgerät. Die Zweiphasenmotoren *11)* und *13)* gehören zum $x_1 - x_2$-Schreiber (nicht im Diagramm eingezeichnet), der gleichzeitig die umgeformte Funktion Θ_2 und ihr Integral Θ_3 aufschreibt

also sowohl für Messungen im optischen Spektralbereich, von Röntgenmikroradiogrammen wie auch für Interferenzmessungen angewandt werden. Gleichzeitig mit der Aufzeichnung der der Substanzmenge proportionalen Funktion wird diese laufend so integriert, daß aus der Aufschreibung die Totalmenge absorbierender Substanz direkt ablesbar ist, die der Meßstrahl auf dem Meßweg getroffen hat. Mit einer einfachen Umkopplungsanordnung kann der Funktionsumformer und Inte-

grator für multiple Linienabsuchung und für Flächenabsuchen angewandt werden (vgl. oben).

Aus dieser Darstellung geht hervor, daß der Zweig der Mikrochemie, der sich mit den Elementarstrukturen der Zellen befaßt, welche die lebende Materie aufbauen, ein recht spezialisiertes Arbeitsgebiet ist. Die Ausbildung der Methodik ist hier in besonders hohem Grade von den speziellen Verhältnissen geprägt, wie sie im Zellmaterial herrschen. Es ist undenkbar, daß eine ganz universelle Arbeitsmethodik für dieses Forschungsgebiet entwickelt werden könnte. Aber durch geeignete Koordination einer Reihe von Methoden, die jede für sich den Forderungen der hohen Auflösung und Empfindlichkeit für jede einzelne der zu untersuchenden Stoffgruppen entspricht, kann man zu einem Arbeitssystem mit der wichtigsten Voraussetzung für allgemeine quantitative Forschung im Dimensionsbereich der Zellstrukturen kommen: Außer der Bestimmung einer großen Anzahl organischer Verbindungen mit Absorptionen im optischen Spektralbereich können Trockengewicht und verschiedene Elemente direkt in der Zelle ermittelt werden. Die optischen Methoden haben — wie ich schon ausführte — den außerordentlichen Vorteil des sehr hohen Auflösungsvermögens. Es reicht mit direkter Meßtechnik bis in die nächste Nähe der makromolekularen Dimensionen, und wir haben einen kontinuierlichen Übergang zu den indirekten Methoden, welche die molekulare Konfiguration der Stoffe durch Diffraktionsmessungen verschiedenster Art festzustellen vermögen. Die Begrenzung der direkten mikrospektrographischen Methoden liegt in der Anzahl der zugänglichen Substanzen. Werden aber die Anforderungen an das Auflösungsvermögen um einige Größenordnungen heruntergesetzt, können die gleichen optischen Verfahren auf „indirekte" Weise angewandt werden, z. B. unter vielen anderen Möglichkeiten zur Ablesung kolorimetrischer Reaktionen in der Ultramikroskala. Auf diese Art wird eine bedeutende Verbreiterung des Arbeitsfeldes denkbar. Durch Kombination von direkten spektrographischen Methoden mit höchster Auflösung und ultramikrochemischen Verfahren anderer Art, welche die Mikrospektrographen zur Registrierung benutzen und dadurch wesentlich über die Größenordnung der Reichweite gewöhnlicher mikrochemischer Methoden herauskommen, dürfte das Anwendungsfeld der quantitativen Cytochemie künftig beträchtlich erweitert werden.

Zusammenfassung

Die mikrochemische Untersuchung einzelner Strukturen in lebenden Zellen verlangt die Entwicklung von Gruppen spezieller Methoden. Diese Forderung ist in erster Linie durch die minimale Größe dieser Strukturen und ferner durch ihre Empfindlichkeit bedingt. Es wurden verschiedene Wege gegangen, die vor allem auf qualitative Untersuchung

zielten, aber infolge technischer Schwierigkeiten doch nur begrenzten Wert haben.

Nunmehr wurde versucht, wirklich quantitative Methoden für das in Frage kommende Dimensionsgebiet zu entwickeln, die sich gleichzeitig speziell für das biologische Objekt eignen sollen. Innerhalb dieses Institutes wurde ein Programm aufgestellt, das die Ausnutzung der optischen mikrospektrographischen Methoden bis an die Grenze ihrer Möglichkeiten für Zellstrukturuntersuchung zum Ziel hat. Durch die Kombination von spektrographischem Messen in verschiedenen Wellengebieten, weitgehende Automatisierung der Meßverfahren und der Werteanalyse, sowie durch Entwicklung einer Reihe von Hilfsmethoden wurde eine Gruppe von Apparaten und Arbeitsverfahren geschaffen, die es ermöglichen, in Routinearbeit eine große Anzahl im optischen Gebiet absorbierender Substanzen mit besserer Auflösung als 1 μ in situ zu messen, Trockengewichtsbestimmungen und die Analyse gewisser Elemente innerhalb der Zellstrukturen durchzuführen.

Summary

The microchemical investigation of individual structures in living cells requires the development of groups of special methods. This requirement is conditioned primarily by the minimum size of these structures and further by their sensitivity. Various paths were followed, whose objective was qualitative study above all, but they had no more than limited value because of technical difficulties.

It has now been attempted to develop really quantitative methods for the region of dimensions involved, and these should also be suitable in particular for the biological objective. A program has been set up in the writer's department with the goal of employing to the greatest possible limit the optical microspectrographic methods for studying cell structures. By combining spectrographic measurements in various wave ranges with automation of the measuring process and analysis of the data, and also by developing a series of auxiliary methods, it was possible to create a group of devices and procedures which made it possible, in routine work, to measure in situ a large number of absorbing substances in the optical range with better resolution than 1 μ. It was also possible to make dry weight determinations and analyses of certain elements within the cell structures.

Résumé

L'étude microchimique de structures particulières dans des cellules vivantes exige la mise au point d'un groupe de méthodes spéciales. Cette exigence résulte au premier chef de la petite taille de ces structures et encore plus de leur sensibilité. On étudie plusieurs méthodes qui visent avant tout à une étude qualitative, mais qui par suite de difficultés techniques n'ont encore qu'une valeur restreinte.

On a donc recherché des méthodes réellement quantitatives pour le domaine de dimensions envisagé qui puissent en même temps servir en biologie. Un programme fut établi dans cet institut avec comme but l'exploitation des méthodes de microspectrographie optique jusqu'à la limite de leurs

possibilités. La juxtaposition de mesures spectrographiques dans différents domaines de longueurs d'onde, une large automaticité des procédés de mesure, l'étude des résultats aussi bien que la découverte de toutes une série de méthodes auxiliaires, ont permis la mise au point d'un groupe d'appareils et de méthodes de travail. Ceux-ci permettent pour du travail de routine d'étudier in situ avec une sensibilité inférieure à 1 μg un grand nombre de substances opaques à la lumière visible ainsi que d'effectuer *des déterminations de poids* et le dosage d'éléments à l'intérieur de la structure cellulaire.

Literatur

[1] *T. Caspersson*, Skand. Arch. Physiol. **73**, Suppl. 8 (1936).

[2] *T. Caspersson*, Chromosoma **1940**, 562.

[3] *T. Caspersson*, Cell Growth and Cell Function. New York: Norton and Co. 1950.

[4] *T. Caspersson*, Genetica Iberica **2**, 277 (1950).

[5] *T. Caspersson*, Exptl. Cell Research **1**, 595 (1950).

[6] *T. Caspersson*, Exptl. Cell Research **7**, 598 (1954).

[7] *T. Caspersson*, Conf. et Rapp. Congr. Intern. Gyn. et d'Obstr. Vol. I. Genève 1954.

[8] *T. Caspersson*, Verh. Anat. Ges., Münster 1954.

[9] *T. Caspersson*, Anais da Ac. Bras. **26**, 529 (1954).

[10] *T. Caspersson*, Exper. **11**, 45 (1955).

[11] *T. Caspersson*, *L. Carlson* und *G. Svensson*, Exptl. Cell Research **7**, 601. (1954).

[12] *T. Caspersson*, *T. Fredriksson* und *K. G. Thorsson*, Hereditas **49**, 201 (1953).

[13] *T. Caspersson*, *F. Jacobsson* und *G. Lomakka*, Exptl. Cell Research **2**, 301 (1951).

[14] *T. Caspersson*, *F. Jacobsson*, *G. Lomakka*, *G. Svensson* und *R. Säfstrøm*, Exptl. Cell Research **5**, 560 (1953).

[15] *T. Caspersson*, *G. Lomakka*, *G. Svensson* und *R. Säfstrøm*, Exptl. Cell Research Suppl. **3**, 40 (1955).

[16] *A. Engstrøm*, Acta Radiol. Suppl. **63** (1946).

[17] *A. Engstrøm* und *B. Lindstrøm*, Biochim. Biophys. Acta **4**, 351 (1950).

[18] *B. Lindstrøm*, Exptl. Cell Research **6**, 537 (1954).

[19] *B. Lindstrøm*, Acta Radiol. Suppl. 125 (1955).

[20] *B. Lindstrøm* und *G. Moberger*, Exptl. Cell Research **6**, 540 (1954).

[21] *G. Lomakka*, Exptl. Cell Research **7**, 603 (1954).

[22] *G. Lomakka*, Exptl. Cell Research, in publ. (1955).

[23] *G. Moberger*, Acta Radiol. Suppl. 112 (1954).

[24] *G. Moberger*, *B. Lindstrøm* und *L. Andersson*, Exptl. Cell Research **6**, 228 (1954).

[25] *F. Ruch*, Exptl. Cell Research **2**, 680 (1951).

[26] *G. Svensson*, Exptl. Cell Research **6**, 529 (1954).

[27] *G. Svensson*, Exptl. Cell Research, in publ. (1955).

Max-Planck-Institut für Chemie, Mainz

Anwendung der Radioaktivität in der analytischen Chemie

Von

Hans Götte

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 9. Mai 1955)

Als im Jahre 1913 *Hevesy* und *Paneth* das RaD, ein natürlich radioaktives Bleiisotop, als Radio-Indikator benutzten, um die Löslichkeit des Bleisulfids in Wasser zu bestimmen, wurde in die analytische Chemie eine neue Methode eingeführt, deren Bedeutung man damals nicht absehen konnte, da um diese Zeit nur wenige radioaktive Isotope der letzten Elemente des Periodischen Systems für das Verfahren geeignet waren. 1934 entdeckte dann *Joliot-Curie* die künstliche Radioaktivität und wenig später fand *Fermi*, daß es möglich war, Neutronen an Atomkerne anzulagern und so radioaktive Isotope fast aller Elemente herzustellen. Damit wurden die Grenzen der Methode erweitert und diese auf fast das gesamte Periodische System ausgedehnt. Dennoch konnten sich die radioaktiven Atomarten in die analytische Chemie nicht einbürgern. Sie ließen sich nur mit einem Cyklotron oder einem Hochspannungsgenerator bzw. mit Radium-Beryllium-Quellen an wenigen Plätzen und nur in beschränktem Maße erzeugen, so daß nur sehr vereinzelt analytische Probleme mit ihrer Hilfe zu lösen waren. Erst als die von *Hahn* und *Straßmann* 1939 aufgefundene Uranspaltung dazu führte, daß Uranreaktoren aufgestellt wurden, konnten radioaktive Atomarten in so großem Umfang erzeugt werden, daß sie heute jedem Chemiker zugänglich sind.

Das von *Hevesy* und *Paneth* eingeführte Verfahren beruht darauf, daß sich radioaktive und stabile Isotope eines Elements chemisch gleich verhalten, wenn sie in chemisch gleicher Form vorliegen. Die beiden Atomarten eines solchen Gemisches, das man als markierte Substanz bezeichnet, entmischen sich daher nicht, wenn sie an einer chemischen Reaktion teilnehmen, und damit wird die von den radioaktiven Atomen

ausgesandte Strahlenmenge ein Maß für die Menge der so gekennzeichneten Mischung.

Mit Hilfe geeigneter Meßinstrumente (Geiger-Müller-Zähler, Szintillationszähler, Ionisationskammer) oder der Photoplatte lassen sich nun die radioaktiven Atome an Hand der von ihnen emittierten Strahlung nachweisen, und es ist so möglich, auf die Menge des gemessenen markierten Stoffes zu schließen. Man spricht daher auch von radiometrischem Verfahren oder radiometrischer Analyse, wenn nach der Radio-Indikatorenmethode gearbeitet wird.

1. Das Analysenverfahren nach Hevesy und Paneth

Es gibt drei Verfahren, um auf dieser Basis quantitative Analysen durchzuführen: Die Aktivierungsanalyse, das Radio-Indikatoren-Verdünnungsverfahren und ein weiteres, für das ein die Methode kennzeichnender Name fehlt. Nach dieser letztgenannten Methode wurde jedoch die anfangs erwähnte erste quantitative Analyse von *Hevesy* und *Paneth* durchgeführt[1]. Sie soll daher im folgenden als Hevesy-Paneth-Analyse bezeichnet und zuerst behandelt werden.

Die Hevesy-Paneth-Analyse beruht darauf, daß bei radioaktiv markierten Substanzen, deren Gehalt an Markierungsisotopen je Gewichtseinheit gleich ist, vergleichbare Meßbedingungen vorausgesetzt, Proportionalität zwischen Menge und im Meßgerät festgestellter Radioaktivität besteht. An Stelle der sonst in der Chemie üblichen Meßmethoden, wie Wägung in der Gravimetrie, Volumenmessung in der Gasanalyse oder bei der Titration, Lichtintensitätsmessung bei der Kolorimetrie, tritt also hier die Strahlenmessung. Dabei ist es nicht unbedingt erforderlich, die absolute spezifische Aktivität zu kennen, mit anderen Worten die Anzahl der je Gewichtseinheit vorhandenen Millicurie, sondern es genügt die Kenntnis der relativen spezifischen Aktivität, d. h. die Anzahl der je Gewichtseinheit unter vergleichbaren Umständen mit einem Geiger-Müller-Zählrohr oder einem Szintillationszähler gemessenen Zählrohrausschläge je Minute bzw. die in einer Ionisationskammer unter entsprechenden Bedingungen gemessenen Ionisationsströme.

Das Hevesy-Panethsche Analysenverfahren ist überall dort anwendbar, wo es möglich ist, die quantitativ zu bestimmende Substanz entsprechend der Empfindlichkeitsforderung mit einer so großen spezifischen Aktivität zu markieren, daß die erhaltenen Meßpräparate eine ausreichende Zählrohraktivität aufweisen. Die höchste erreichbare Empfindlichkeit ist gegeben durch die Größe der spezifischen Aktivität, die bei Verwendung trägerfreier radioaktiver Atomarten erzielt werden kann. So lassen sich z. B. mit einem Fensterzählrohr unter den üblichen Meßbedingungen noch etwa $3 \cdot 10^{-16}$ g reiner ^{32}P, $2 \cdot 10^{-14}$ g ^{35}S und $2 \cdot 10^{-9}$ g ^{14}C nachweisen, bzw. eine diesen Gewichten äquivalente Menge mar-

kierter Verbindung, wenn zur Radio-Synthese die reinen Radio-Isotope verwendet wurden.

Diese höchste Empfindlichkeit wird im allgemeinen in der Chemie nicht gefordert. Das Verfahren erlaubt es jedoch, durch geeignete Wahl der spezifischen Aktivität, d. h. durch Beimischen radioinaktiver Verbindung zur radioaktiven, die Empfindlichkeit beliebig zu variieren.

Viel wichtiger als die erreichbare hohe Empfindlichkeit ist die Tatsache, daß es mit Hilfe dieses Verfahrens möglich ist, in vielen Fällen Verbindungen quantitativ zu bestimmen, für die spezifische, selektive und quantitativ verlaufende Reaktionen fehlen oder in Folge der Gegenwart von störenden Begleitsubstanzen nicht durchführbar sind. Die radiometrische Methode bietet überdies bei der quantitativen Analyse organischer Verbindungen den Vorteil, daß die analytische Operation nicht unbedingt mit der quantitativ zu bestimmenden Substanz selbst durchgeführt werden muß. Sie erlaubt es, die schwierige und oft unbekannte Chemie von aus komplizierten Molekülen aufgebauten Verbindungen durch die meist gut bekannte der einfachsten Verbindungen, die das zur Markierung herangezogene Element eingehen kann, zu ersetzen, d. h. in der Mehrzahl der Fälle durch die Chemie seiner Ionen in wäßriger Lösung. Denkt man an die zahlreichen Verbindungsklassen der organischen Chemie und die dazugehörigen Einzelverbindungen, deren Chemie nicht nur von einer Verbindungsklasse zur anderen, sondern auch unter Verbindungen der gleichen Klasse verschieden ist, so lassen sich unschwer die Vorzüge eines derartigen analytischen Verfahrens abschätzen.

Die genannte Vereinfachung der chemischen Operationen wird bei organischen Substanzen erreicht, indem die markierten Verbindungen gemeinsam mit sie etwa begleitenden Fremdstoffen auf trockenem oder nassem Wege verascht werden. Das markierte chemische Element und damit die zu einer Markierung verwendete radioaktive Atomart sind dann in der durch den Oxydationsvorgang bedingten chemischen Form vorhanden und lassen sich in den meisten Fällen von den übrigen durch den Veraschungsvorgang umgewandelten Verbindungsbestandteilen trennen, sammeln und zur Messung bringen. In dieser Weise lassen sich organische Verbindungen, die Schwefel, Phosphor, Arsen oder Halogene enthalten, sowie die meisten metallorganischen Verbindungen mit dem radiometrischen Verfahren quantitativ bestimmen, indem man das nach der Veraschung anfallende Sulfat, Phosphat, Arsenat usw. oder die betreffenden Metallionen abscheidet und auf ihren Gehalt an Radioaktivität untersucht.

Es bietet sich aber noch ein weiterer Vorteil. Sehr oft ist bei Forderung sehr hoher Nachweisempfindlichkeit die Menge der nachzuweisenden Verbindung so gering, daß die aus ihr nach der Veraschung gewonnene radioaktive Substanz selbst nach den Methoden der Mikrochemie schwer zu

handhaben ist. In diesem Fall setzt man inaktives Material gleicher chemischer Form in bekannter Menge als Träger zu und kann so mit den Makroverfahren der Chemie arbeiten.

Die Zugabe von Trägern kann auch dann erforderlich werden, wenn die zur Messung anfallende Substanz eine zu hohe spezifische Aktivität zeigt. Man verringert dann diese in bekannter Weise und mißt nur einen aliquoten Teil der anfallenden Menge.

Umgekehrt ist darauf zu achten, daß die nichtmarkierten Begleitsubstanzen ebenfalls das in der analytisch zu bestimmenden Verbindung enthaltene und zur Markierung verwendete Element aufweisen können, so daß nun die Menge des zu messenden Materials um einen entsprechenden, häufig unbekannten Betrag größer ist. In derartigen Fällen muß die Gesamtmenge des aktiven Materials quantitativ bestimmt werden, um die durch die Beimischung nichtradioaktiver Substanz verursachte Verringerung der spezifischen Aktivität korrigieren zu können. Hier wird die Empfindlichkeitsgrenze also zusätzlich durch die unter Umständen vorhandene Menge Begleitsubstanz beeinflußt, da häufig mehr Meßsubstanz entsteht, als sich unter einem Geiger-Müller-Zählrohr messen läßt. Das gilt besonders bei Markierung von organischen Molekülen mit ^{14}C, wenn die zu analysierende Substanz verascht und das entstehende radioaktive Kohlendioxyd entweder direkt im Gasstrom, oder nach Überführung in Bariumcarbonat gemessen wird, weil hier die aus organischem und biologischem Begleitmaterial anfallenden Mengen inaktiven Kohlenstoffs besonders groß sind.

Aus dem Vorangehenden läßt sich erkennen, daß selbst in Fällen, in denen die quantitativ zu bestimmende Verbindung vor der Analyse chemisch verändert wird, so daß nach den klassischen Analysenverfahren ihre Bestimmung unmöglich ist, ihre quantitative Analyse dennoch durchgeführt werden kann. Dergleichen analytische Probleme treten z. B. in der Pharmakologie und Physiologie auf, wenn verabreichte Stoffe im Organismus umgebaut werden, so daß evtl. vorhandene spezifische Nachweisreaktionen für sie versagen müssen. Bei der Analyse der hier beschriebenen Art wird jedoch nach der Veraschung das Markierungselement unabhängig von der Form, in der es sich befindet, in die zu messende Substanz übergeführt, so daß die quantitative Analyse der markierten Verbindung möglich wird, obwohl sie unmittelbar vor Analysenbeginn unter Umständen gar nicht mehr existiert.

Das Hevesy-Paneth-Verfahren hat in erster Linie Bedeutung, wenn es gilt, den Verbleib organischer Substanzen quantitativ zu verfolgen, wie dies z. B. in der Pharmakologie erforderlich ist. Da die in der organischen Chemie wichtigen Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Phosphor, Schwefel, Jod, Arsen und Antimon durch Radioisotope vertreten sind, die sich in sehr hohen spezifischen Aktivitäten herstellen lassen, kann jeder normaler-

weise in der Chemie auftretenden Forderung nach Empfindlichkeit Genüge getan werden. Es steht hier eine Methode zur Verfügung, die — anpassungsfähig wie kaum eine andere — den gesamten Bereich der ultramikro-, der mikro- und der makroquantitativen Analyse zu überdecken vermag. Ihre einzigartige Spezifität bringt es mit sich, daß jede Störung der Analyse durch chemisch ähnlich reagierende Stoffe ausgeschlossen wird.

Die Grenzen der Havesy-Paneth-Analyse ergeben sich daraus, daß nur markierte Verbindungen bestimmt werden können. Sie läßt sich also nur dann durchführen, wenn die Markierungssynthese des zu markierenden Stoffes gelingt. Man kann daher mit ihrer Hilfe keinerlei vorgegebene Gemische quantitativ analysieren. Aus diesem Grunde wird sie nur in den seltensten Fällen brauchbar sein, um Routineanalysen auszuführen, sondern mehr dazu dienen, einmalig auftretende spezielle analytische Probleme zu lösen.

2. Die radiometrische Korrektur

In Kombination mit anderen Analysenmethoden erlaubt das Hevesy-Paneth-Verfahren, bekannte chemische Reaktionen, die schwierig quantitativ durchzuführen sind, für die quantitative Analyse zu benutzen. Man bezeichnet diese Methode als radiometrische Korrektur. Diese erlaubt es, einen Stoff quantitativ zu bestimmen, ohne daß die gesuchte Menge durch den Analysengang quantitativ erhalten bleiben muß. Es genügt vielmehr, einen beliebigen Teil in einer für das verwendete Analysenverfahren ausreichend reinen Form zu gewinnen und diesen auf gravimetrischem, kolorimetrischem oder maßanalytischem Wege quantitativ zu bestimmen. Damit wird die quantitative Analyse aller derjenigen Stoffe wesentlich erleichtert, die schwer ohne Mitfällung anderer, chemisch ähnlicher abzuscheiden sind. Das Verfahren ist am besten an einem Beispiel zu erläutern:

Es ist schwierig, Cer aus einem Gemisch mit anderen Seltenen Erden quantitativ und ohne Verunreinigung auszuscheiden. Verhältnismäßig leicht hingegen ist es, einen unbekannten Bruchteil des Cers in chemisch reiner Form zu gewinnen. Gelingt es, festzustellen, wie groß dieser Bruchteil ist, so läßt sich nach Bestimmung seines Absolutwertes der Gesamtgehalt an Cer mit Hilfe radioaktiver Isotope errechnen[2].

Man geht dabei so vor, daß man zu der zu analysierenden Cer-Lösung etwas radioaktives ^{144}Ce setzt. Die hierfür nötige Menge ist so gering, daß sie gewichtsmäßig nicht zu erfassen ist. Sie beträgt etwa $2 \cdot 10^{-9}$ g. Es tritt daher keine im Bereich der analytischen Nachweisbarkeit liegende Vermehrung des Cers ein. Die zugesetzten radioaktiven Atome unterscheiden sich, da sie mit den inaktiven Cer-Atomen isotop sind, chemisch nicht von diesen. Bestimmt man also die Gesamtaktivität des gemischten

Präparates, so stellt diese ein Maß für die Gesamtmenge des vorhandenen Cers dar. Man trennt nun aus der zu analysierenden Lösung einen beliebigen Teil des Cers ab, indem es nach der Oxydation mit Natriumbromat und Salpetersäure als Cerjodat mit Natriumjodat aus dem Gemisch der übrigen Seltenen Erden abgeschieden wird. Der Niederschlag, der durch andere Seltene Erden (Praseodym) verunreinigt ist, wird in Salpetersäure gelöst und noch einmal mit Natriumjodat in Gegenwart von Natriumbromat ausgefällt. Diese Umfällung wird wiederholt, bis das vorhandene Cer spektroskopisch rein ist. Der Bruchteil, den das so gewonnene Cer-Präparat von der Gesamtmenge des ursprünglichen Cers darstellt, wird nun durch Bestimmung der Aktivität des Präparates ermittelt. Es ist jetzt nur noch nötig, das spektroskopisch reine Cer-Präparat mit Hilfe einer beliebigen analytischen Methode — photometrisch — quantitativ zu bestimmen und den erhaltenen Wert mit dem durch die radiometrische Analyse festgestellten zu multiplizieren, um die Gesamtmenge des Cers berechnen zu können.

Es liegt auf der Hand, daß sich dieses Prinzip der Markierung einer quantitativ zu bestimmenden Substanz benützen läßt, um die Vollständigkeit einer quantitativen Analyse zu kontrollieren. Dazu wird dem zu bestimmenden Element innerhalb des zu untersuchenden Gemisches in unwägbarer Menge ein geeignetes seiner Radioisotope zugegeben und nach Abschluß der Analyse festgestellt, ob die Gesamtaktivität in dem zur quantitativen Bestimmung verwendeten Niederschlag oder der maßanalytisch untersuchten Lösung vorhanden ist. Jeder Verlust an Substanz während der Abtrennung von anderen Elementen zeigt sich in der Verminderung der gemessenen Aktivität.

3. Das Radio-Indikatoren-Verdünnungsverfahren

Während die Analysenmethode von *Hevesy* und *Paneth* fordert, daß die Gesamtheit der radioaktiven Atome der zu bestimmenden Substanz oder zum mindesten ein bekannter Bruchteil davon bei der Messung erfaßt werden müssen, ist dies bei den Radio-Indikatoren-Verdünnungsverfahren nicht notwendig. Diese Analysenmethode hat ihre Grundlage darin, daß die spezifische Aktivität einer radioaktiv gekennzeichneten Substanz durch Zugabe nicht-markierter Verbindung gleicher Art verringert wird. Man kann mit Hilfe dieses Verfahrens ebenso wie mit der Methode der radiometrischen Korrektur eine innerhalb eines Stoffgemisches vorliegende Substanz quantitativ bestimmen, ohne sie quantitativ abtrennen zu müssen. Es genügt vielmehr, einen beliebigen Bruchteil in chemisch reiner Form zu isolieren und seine Zählrohraktivität zu ermitteln. Damit ist eine zweite Möglichkeit gegeben, Verbindungen quantitativ zu analysieren, die sich nicht gleichzeitig chemisch rein und quantitativ abscheiden lassen. Überdies ist die Methode geeignet,

von einer analytisch zu verfolgenden Substanz denjenigen Anteil zu ermitteln, der im Falle einer chemischen Reaktion mit anderen Stoffen nicht umgesetzt zurückbleibt, wenn die entstehenden Reaktionsprodukte stabil sind und nicht mit den Ausgangsmaterialien im Gleichgewicht stehen. Im Gegensatz zur radiometrischen Korrektur arbeitet das Radio-Indikatoren-Verdünnungsverfahren rein radiometrisch.

Man muß zwei Variationen dieses Verfahrens unterscheiden. Die eine erlaubt es, radioinaktive Verbindungen zu bestimmen. Dazu wird dem Gemisch, das die zu bestimmende Substanz in unbekannter Menge enthält, eine bekannte Quantität markierter Verbindung gleicher Art und bekannter spezifischer Aktivität zugesetzt und dafür gesorgt, daß sich radioaktives und radioinaktives Material homogen vermischt. Anschließend isoliert man einen beliebigen Bruchteil der quantitativ zu ermittelnden Substanz, d. h. des homogenen Gemisches aus unbekannter radioinaktiver und bekannter radioaktiver Verbindung, und bestimmt die spezifische Aktivität dieser Mischung. Beträgt die Zählrohraktivität der bekannten zugesetzten Menge a z_1, so berechnet sich die spezifische Aktivität zu $S_1 = z_1/a$. Nach Zugabe der unbekannten Menge sinkt letztere auf den Betrag $S_2 = z_1/(a + x) = z_2/b$. Diese wird an dem Bruchteil b, dessen Zählrohraktivität z_2 ist, gemessen. x errechnet sich dann aus

$$x = a\left(\frac{S_1}{S_2} - 1\right). \tag{1}$$

Umgekehrt ist es möglich, durch Zusatz einer bekannten Menge radioinaktiver Verbindung eine unbekannte Menge markierter Substanz zu bestimmen, wenn deren spezifische Aktivität bekannt ist. Das Verfahren eignet sich also für Fälle, in denen man die spezifische Aktivität der zu analysierenden Verbindung durch Bestimmung der Zählrohraktivität einer kleinen Probe p ermitteln kann. Es ist also $S_1 = z_p/p = z_x/x$, wobei z_p die Zählrohraktivität der Probe p und z_x die nicht bekannte Zählrohraktivität der unbekannten Menge der zu bestimmenden Substanz in dem zu analysierenden Gemisch bedeutet. Nach Zugabe einer bekannten Menge a nichtmarkierter Verbindung, die ebenfalls homogen mit der im Gemisch vorhandenen gesuchten Substanz vermischt werden muß, ergibt sich die spezifische Aktivität der Mischung radioaktiver und radioinaktiver Verbindung zu $S_2 = z_x/(x + a) = z_b/b$, wenn z_b für die Zählrohraktivität der chemisch rein isolierten Probe b steht. Die unbekannte Menge der gesuchten Substanz errechnet sich dann zu

$$x = S_2 \cdot a/(S_1 - S_2). \tag{2}$$

Da das erstgenannte Verfahren erlaubt, mit Hilfe markierter Substanzen die quantitative Analyse radioinaktiver Verbindungen vorzunehmen, besteht hier, falls die zu bestimmende Verbindung radio-

aktiv markiert hergestellt werden kann, eine Möglichkeit, Routineanalysen auszuführen und vorgegebene Gemische auf den Gehalt eines nach anderen Methoden schwer quantitativ zu ermittelnden Stoffes zu untersuchen. Ein schönes Beispiel für eine derartige Anwendung ist die Naphthalinbestimmung im Rohteer mittels ^{14}C-Naphthalin.

Die zweite Art der Verdünnungsanalyse ist ein wertvolles Hilfsmittel, wenn markierte Verbindungen hergestellt werden sollen. Sie ermöglicht es, in jeder Stufe die Ausbeute an einem sehr kleinen, aus dem Reaktionsgemisch entnommenen Teil zu bestimmen, wenn man die molspezifische Aktivität der Ausgangssubstanz kennt und diese während der Reaktionsfolge erhalten bleibt. Damit kann in vielen Fällen die jeweils folgende Stufe der Synthese angesetzt werden, ohne daß es notwendig ist, die in der vorhergehenden gewonnene markierte Verbindung zu isolieren. Es werden so die mit der Isolierung stets verbundenen Verluste vermieden, die bei dem hohen Preis radioaktiver Substanzen sehr ins Gewicht fallen können.

Beide Verfahren spielen eine große Rolle beim Studium von Stoffwechselvorgängen.

Das Radio-Indikatoren-Verdünnungsverfahren wird ebenfalls in erster Linie der organisch-quantitativen Analyse dienen. Es zeichnet sich unter der Voraussetzung, daß es gelingt, das zu messende Gemisch von markierter und nichtmarkierter Verbindung chemisch rein zu isolieren, durch hohe Spezifität aus.

4. Die Radioaktivierungsanalyse

Das dritte Analysenverfahren, das radioaktive Atomarten verwendet, ist die Radioaktivierungsanalyse. Sie beruht darauf, daß es gelingt, von den meisten chemischen Elementen durch Atomkernreaktionen radioaktive Kernarten herzustellen. In erster Linie kommen dabei die in der Abbildung gezeigten Kernprozesse in Betracht, die sich mit Hilfe von Teilchenbeschleunigern (Cyklotron, Kaskadengenerator), natürlich radioaktiven Präparaten (Ra bzw. Po) oder Kernreaktoren durchführen lassen (Abb. 1). Die wichtigste dieser Reaktionen ist die, bei der den bestrahlten Atomkernen ein Neutron angelagert wird, d. h. also Isotope des bestrahlten Elements entstehen. Dieser Kernprozeß läßt sich sowohl mit Hilfe einer Ra + Be-Neutronenquelle als mit einem Uranreaktor durchführen und ist die Grundlage der meisten radioaktivierungsanalytischen Untersuchungen. Mit ihm wurde die Methode durch *Hevesy* und *Levi* 1936 auch eingeführt, um geringe Mengen von Dysprosium in Yttriumpräparaten nachzuweisen. Das Verfahren arbeitet so, daß man die zu untersuchende Substanz, in der ein Element quantitativ bestimmt werden soll, dem Neutronenstrom einer Neutronenquelle bzw. dem Strom der geladenen Teilchen eines Partikelbeschleunigers aussetzt und

die nach geeigneter Zeit entstandenen radioaktiven Atome durch Messung mit einem Geiger-Müller-Zähler oder einer Ionisationskammer ermittelt. Mit diesen Instrumenten wird eine der Zerfallsrate, d. h. der Zahl der sich in der Zeiteinheit umwandelnden Atome proportionale Größe, die Zählrohr- oder Ionisationskammeraktivität, gemessen. Kennt man den Proportionalitätsfaktor, d. h. den Nutzeffekt des Meßinstruments, so kann man die Zerfallsrate selber berechnen.

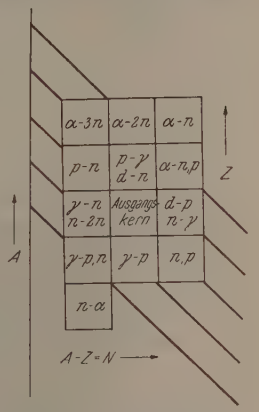


Abb. 1. Veränderung von N, Z und A eines Atomkerns durch Kernreaktionen mit α-Teilchen, Deuteronen, Protonen, Neutronen und γ-Quanten
A = Massenzahl
Z = Kernladungszahl
N = Neutronenzahl

Von der radioaktiven Atomart werden, konstanten Strom der Teilchen, die die Kernreaktion ablaufen lassen, vorausgesetzt, in der Zeiteinheit eine konstante Menge q Atome erzeugt. Von diesen zerfallen auf Grund ihrer Radioaktivität in der Zeiteinheit eine bestimmte Menge $N_a \cdot \lambda_a$. Es gilt daher

$$\frac{dN_a}{dt} = q - \lambda_a N_a, \qquad (3)$$

wobei N_a die Zahl der gebildeten radioaktiven Atome, λ_a die Zerfallskonstante dieser Atomart und t die Zeit bedeuten. Die Verhältnisse liegen also hier genau so wie bei der Nachbildung einer von ihrer langlebigen Muttersubstanz abgetrennten kurzlebigen Tochtersubstanz. Integriert man die obige Gleichung, so erhält man

$$\lambda_a N_a = q\,(1 - e^{-\lambda a t}). \qquad (4)$$

Die Zerfallsrate der entstehenden radioaktiven Atomart ist also proportional einem Faktor, in den die Zeit t eingeht und einer Größe q. Bei der Nachbildung einer kurzlebigen Tochtersubstanz aus einer langlebigen Muttersubstanz ist die Entstehungsrate des Folgeproduktes gleich der Zerfallsrate der Muttersubstanz, also $q = \lambda_m \cdot N_m$, d. h. proportional der Anzahl der vorhandenen Atome der zerfallenden Atomart. Bei der Radioaktivierung ist $q = N_x f \sigma_x$. Dabei bedeutet N_x die Zahl der vorhandenen reaktionsfähigen Atome, f den Partikelfluß, also z. B. die Anzahl der Neutronen je sek und cm², und σ_x einen Proportionalitätsfaktor, den man den Wirkungsquerschnitt der ablaufenden Kernreaktion nennt. Die Gleichung nimmt damit die Form*

* Gleichung (5) gilt nur für Reinelemente, d. h. für solche, die lediglich ein stabiles Isotop besitzen. Sind mehrere vorhanden, so muß die relative Häufigkeit h desjenigen Isotops berücksichtigt werden, an dem die Kernreaktion abläuft. Ist σ_x ihr Wirkungsquerschnitt, so ist diese Größe mit h zu multiplizieren.

$$N_a \cdot \lambda_a = N_x f\, \sigma_x (1 - e^{-\lambda_a t}) \tag{5}$$

an. Kennt man f und σ_x, so läßt sich aus der mit einem Zählrohr bekannten Nutzeffekts bestimmten Zählrate $N_a \lambda_a$ am Ende der Bestrahlung N_x und damit die Menge des bestrahlten Materials errechnen. Sie ergibt sich zu

$$x = \frac{N_a \lambda_a \cdot M}{6{,}02 \cdot 10^{23} \cdot f \cdot \sigma_x \cdot (1 - e^{-\lambda_a t})}. \tag{6}$$

Voraussetzung für gute Resultate nach dieser Methode sind genaue Kenntnis des Nutzeffektes des verwendeten Meßgerätes für die von dem betreffenden radioaktiven Nuklid emittierte Strahlung, konstanter und genau bekannter Neutronenfluß und genaue Kenntnis des Wirkungsquerschnitts. Da letzterer von der Energie der die Kernreaktion hervorrufenden Teilchen abhängig ist, muß auch diese bekannt und einheitlich sein. Alle diese Größen sind nicht sehr leicht exakt zu bestimmen, so daß es erheblicher physikalischer Kenntnisse bedarf, um auf dieser Grundlage Analysen zu machen.

Es besteht jedoch die Möglichkeit, die sich ergebenden Fehlerquellen zu umgehen, indem man zusammen mit dem Präparat, das die unbekannte Menge des zu bestimmenden Elements enthält, eine bekannte Standardmenge unter gleichen Bedingungen mitbestrahlt. Dann verhalten sich die entstandenen Mengen der radioaktiven Atomart von Standard N_{aSt} und markierter Menge N_{ax} wie die des Elements in Standard St und zu untersuchender Probe und aus dem Verhältnis der unter gleichen Bedingungen gemessenen Zählraten läßt sich unmittelbar die zu ermittelnde Quantität errechnen.

$$\frac{Z_x}{Z_{St}} = \frac{N_{ax}}{N_{aSt}} = \frac{x}{St}. \tag{7}$$

Bei diesem Verfahren heben sich die möglichen Fehler heraus, da Standard und Probe unter gleichen Verhältnissen aktiviert untersucht werden.

Die durch Kernprozesse entstehenden radioaktiven Atomarten unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit, der Art und Energie der von ihnen ausgesandten Strahlung und in ihrer chemischen Zugehörigkeit. Es treten also zu den üblichen Identifizierungs- und Bestimmungsmöglichkeiten auf Grund der chemischen Eigenschaften zwei weitere Qualitäten hinzu, die es erlauben, die untersuchte Atomart von anderen zu unterscheiden und so die quantitative Analyse des Elements, aus dem sie entstanden ist, durchzuführen.

Bereits die erste Unterscheidungsmöglichkeit auf Grund der verschiedenen Halbwertszeiten bringt eine Reihe von Vorteilen mit sich. Elemente, deren radioaktive Isotope sich durch ihre Halbwertszeit unterscheiden, lassen sich in vielen Fällen nachweisen, ohne daß es

nötig ist, sie chemisch zu trennen, so daß man zerstörungsfreie Analysen durchführen kann. Durch geeignete Wahl der Bestrahlungsdauer bzw. der Zeit zwischen Bestrahlungsende und Beginn der Messung wird es möglich, die gewünschte Radioaktivität bevorzugt neben der anderen zu messen.

Ist das zum Nachweis verwendete Radioisotop des zu bestimmenden Elementes kurzlebig und sind die anderen im bestrahlten Präparat auftretenden Radioaktivitäten langlebig, so kann man durch kurze Bestrahlung und unmittelbar im Anschluß an diese beginnende Messung ersteres gut neben den letzteren auszählen. Die Zerfallsrate kurzlebiger Atomarten steigt nämlich nach Gleichung (5), wenn die übrigen Bedingungen annähernd gleich sind, schneller an als die der langlebigen. Die entstandene Radioaktivität klingt nach dem Gesetz des radioaktiven Zerfalls $A_t = A_o e^{-\lambda_a t}$ je nach der Größe des λ_a schneller oder langsamer ab. Die gemessenen Zählrohraktivitäten setzen sich aus den Zählrohraktivitäten der einzelnen vorhandenen radioaktiven Atomarten zusammen. Trägt man die gemessenen Zählraten auf die logarithmisch geteilten Ordinaten eines Diagrammes auf, dessen metrische Abszisse die Zeit darstellt, so lassen sich aus dem entstehenden Kurvengang die den einzelnen radioaktiven Atomarten zugehörigen Zählrohraktivitäten durch graphische Kurvenanalyse ermitteln, wenn die Halbwertszeiten genügend — d. h. um mindestens den Faktor 5 — auseinander liegen (Abb. 2). Durch Extrapolation der durch die graphische Analyse ermittelten geraden Linie läßt sich die Zählrohraktivität der jeweils untersuchten Atomart zur Zeit des Bestrahlungsendes festlegen. Man erhält damit die für die Gleichung (7) benötigten Werte.

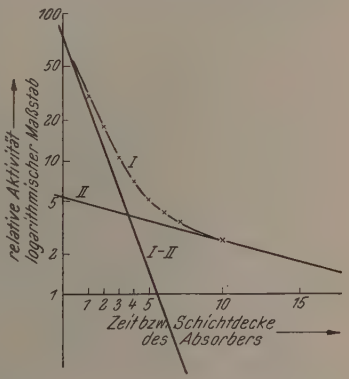


Abb. 2. Überlagerung der Abklinggeraden zweier Aktivitäten verschiedener Halbwertszeiten zu einer gemeinsamen Abfallskurve, bzw. Überlagerung zweier Absorptionsgeraden zu einer gemeinsamen Absorptionskurve. *I—II* erhalten durch graphische Subtraktion

Aber auch wenn die entstehenden radioaktiven Atomarten gleiche oder ähnliche Halbwertszeiten haben, lassen sich auf Grund der zuvor erwähnten Unterschiede eindeutige quantitative Analysen ausführen. Es besteht nämlich die Möglichkeit, radioaktive Atomarten, deren Halbwertszeiten nicht auseinandergehalten werden können, auf Grund der Strahlenart und der Energie der von ihnen emittierten Strahlen zu unterscheiden. Die von den radioaktiven Atomarten ausgesandten Teilchen und Quanten — es handelt sich in der Mehrzahl der Fälle um

β-Strahlen und γ-Quanten — werden in Abhängigkeit von der Energie mehr oder weniger von Materie absorbiert. Die Strahlung wird dabei annähernd nach einem Exponentialgesetz geschwächt, so daß zwischen der gemessenen Zählrate und der Schichtdicke x eines zwischen Präparat und Zählrohr eingeschobenen Absorbers die Beziehung $I = I_0 e^{-\mu x}$ besteht, in der I_0 die Zählrohraktivität ohne Absorber und μ den Absorptionskoeffizienten bedeuten. Unterscheiden sich die Absorptionskoeffizienten der β-Strahlen zweier radioaktiver Atomarten genügend, so läßt sich an Hand eines Diagramms, das die obengenannte Abhängigkeit in halblogarithmischer Darstellung zeigt, die Zählrohraktivität ohne Absorber von jeder der beiden Komponenten nach graphischer Analyse des Kurvenzuges ermitteln (Abb. 2). Soll die härtere der beiden Strahlenarten ausgezählt werden, so besteht die Möglichkeit, die weiche Komponente völlig zu unterdrücken, indem man eine zu ihrer völligen Absorption genügende Folie einschaltet, die aber die energiereiche Strahlung noch in einem für die Zählrohrmessung ausreichenden Maße durchläßt.

Derartige Absorptionsanalysen lassen sich unter Umständen auch dann durchführen, wenn die beiden radioaktiven Atomarten neben den β-Strahlen noch γ-Quanten emittieren[3].

Beide Verfahren versagen, wenn das das langlebige Radionuklid liefernde Element entweder in großem Überschuß vorliegt oder wenn der Wirkungsquerschnitt der zu ihm führenden Kernreaktion sehr viel größer ist als der der Kernreaktion, durch die das kurzlebige entsteht. Auch wenn die von der nachzuweisenden Atomart emittierte β-Strahlung zu energiearm ist, um sich neben den anderen, ebenfalls auftretenden β-Strahlen gut nachweisen zu lassen, sind die Methoden unbrauchbar. In diesen Fällen wird dann das Verhältnis der entstandenen Zählrohraktivitäten so ungünstig, daß die der kurzlebigen Atomart nicht mehr genau genug gemessen werden kann. Entsprechendes gilt für γ-strahlende Atomarten, die sich jedoch, verglichen mit β-Strahlern, bei viel geringeren Energieunterschieden mittels eines Scintillationsspektographen nebeneinander nachweisen lassen.

Unter derartigen Voraussetzungen besteht die Möglichkeit, eine chemische Trennung vorzunehmen und die zu messende radioaktive Atomart vor der Messung mit Hilfe der Trägermethode von den anderen Radioaktivitäten zu isolieren. Da die Radioaktivierung überwiegend mit Neutronen vorgenommen wird, entstehen meistens radioaktive Isotope des zu bestimmenden Elements und diese müssen zusammen mit den stabilen abgeschieden werden. Man gibt daher in derartigen Fällen, nachdem das bestrahlte Material aufgelöst wurde, eine genau bekannte Trägermenge zu, die so groß sein muß, daß die Quantität des zu bestimmenden Elements dagegen vernachlässigt werden kann. Dann wird

homogen vermischt, ein beliebiger Teil des Trägers chemisch und radiochemisch rein isoliert, die Ausbeute bestimmt und der gewonnene Teil gemessen. Aus dem Verhältnis von gewonnener zur Gesamtträgermenge läßt sich dann die Zählrohraktivität der insgesamt bei der Bestrahlung entstehenden radioaktiven Atomart berechnen und damit sind wieder die Voraussetzungen für den Gebrauch der Gleichung (7) gegeben. Das Trägerverfahren kann allerdings nur dann angewendet werden, wenn die für die chemische Trennung benötigte Zeit im Verhältnis zur Halbwertszeit des untersuchten Radionuklids nicht zu groß ist. Andernfalls ist die gesuchte Radioaktivität abgeklungen, bevor zu messen begonnen werden kann.

Das Radioaktivierungsverfahren erlaubt überdies eine Art quantitativer Bestimmung, die mit keinem anderen chemischen Verfahren durchgeführt werden kann. Sie ermöglicht in manchen Fällen die Analyse des Isotopengemisches eines Elementes, d. h. mit ihrer Hilfe kann die Verschiebung der Zusammensetzung eines solchen Gemisches gegenüber dem normalen Mischungsverhältnis bestimmt werden. Aus den verschiedenen Isotopen eines Elementes entstehen, wenn sie mit Neutronen bestrahlt werden, Radioisotope verschiedener Halbwertszeit und Strahlenenergie. Das Verhältnis der bei einer solchen Bestrahlung auftretenden radioaktiven Kerne läßt sich an Hand der entstehenden relativen Aktivitäten ermitteln. Erweist sich dieses Verhältnis im Vergleich zu einer Standardprobe verändert, so läßt sich daraus die Verschiebung des Isotopenverhältnisses berechnen. Derartige Untersuchungen waren bisher der Massenspektroskopie vorbehalten, aber neuere Arbeiten von *Herr*[4] haben gezeigt, in welcher Weise die Radioaktivierungsanalyse diese Methode ergänzen kann.

Die Radioaktivierungsanalyse dient im Gegensatz zu den beiden anfangs beschriebenen Verfahren nur der anorganisch-quantitativen Analyse. Sie zeichnet sich, wenn ein genügend großer Fluß von den die gewünschte Kernreaktion hervorrufenden Partikeln verfügbar ist, durch ungewöhnlich hohe Empfindlichkeit aus (Tabelle 1). Außerdem ist das Verfahren wegen der Möglichkeit, Halbwertszeiten und Strahlenenergien neben der chemischen Zuordnung zur Identifizierung zu gebrauchen, sehr spezifisch. Ein ganz wesentlicher Vorteil dieser Methode, die wie wenig andere geeignet ist, quantitative Spurenanalyse zu treiben, besteht darin, daß es unmöglich ist, das gesuchte Element mit den während der chemischen Operationen benötigten Chemikalien einzuschleppen.

Die Grenzen des Verfahrens sind dadurch gegeben, daß man aus zwei Gründen nur kleine Mengen bestrahlen kann. Einmal lassen es die räumlichen Verhältnisse nicht zu, größere Substanzmengen zu bestrahlen und zum anderen würden größere Proben in ihren äußeren Schichten so viel vom Partikelfluß absorbieren, daß die inneren Teile nicht mehr

Tabelle 1. Empfindlichkeit des radioaktivierungsanalytischen Nachweises für einige Elemente bei Bestrahlung im Uranreaktor bei einem Neutronenfluß von 10^{12}/sek cm²

Element	Zum Nachweis verwendete radioaktive Atomart	Halbwertszeit	Wirkungsquerschnitt des radioaktivierten Isotops	Häufigkeit des radioaktivierten Isotops im Element	Nachweisbare Menge in g
Dy.....	^{165}Dy	140 m	2.800	28,2	$6 \cdot 10^{-13}$
Eu	^{152}Eu	9,3 h	1.000	47,8	$9 \cdot 10^{-13}$
Ir.....	^{192}Ir	70 d	740	38,5	$2 \cdot 10^{-12}$
Rh.....	^{104}Rh	44 s	138	100	$2 \cdot 10^{-12}$
Tm	^{170}Tm	127 d	120	100	$4 \cdot 10^{-12}$
In	^{116}In	54 m	52	95,8	$5 \cdot 10^{-12}$
Lu	^{177}Lu	6,8 d	3.600	2,6	$5 \cdot 10^{-12}$
Co	^{60}Co	5,3 a	34	100	$5 \cdot 10^{-12}$
Au	^{198}Au	2,7 d	95	100	$6 \cdot 10^{-12}$
Ag	^{110}Ag	24 s	85	48,6	$7 \cdot 10^{-12}$
Ir.....	^{194}Ir	19 h	130	61,5	$7 \cdot 10^{-12}$
Ho.....	^{166}Ho	27,2 h	67	100	$7 \cdot 10^{-12}$
Sm	^{153}Sm	47 h	200	26,8	$8 \cdot 10^{-12}$
Tb	^{160}Tb	74 d	55	100	$8 \cdot 10^{-12}$
Re	^{188}Re	18,9 h	74	62,9	$1 \cdot 10^{-11}$
Sc	^{46}Sc	85 d	12	100	$1 \cdot 10^{-11}$
Cs	^{134}Cs	2,3 a	26	100	$1 \cdot 10^{-11}$
Mn	^{56}Mn	2,6 h	12	100	$1 \cdot 10^{-11}$
Ta	^{182}Ta	117 d	21	100	$2 \cdot 10^{-11}$
Ag	^{108}Ag	2,3 m	34	51,4	$2 \cdot 10^{-11}$
Lu	^{176}Lu	3,7 h	20	97,4	$3 \cdot 10^{-11}$
V	^{52}V	3,7 m	4,8	99,8	$3 \cdot 10^{-11}$
Pr	^{142}Pr	19,3 h	11	100	$4 \cdot 10^{-11}$
La	^{140}La	40 h	9	99,9	$4 \cdot 10^{-11}$
As	^{76}As	26,8 h	4	100	$5 \cdot 10^{-11}$
Br	^{80}Br	18 m	8,5	50,6	$5 \cdot 10^{-11}$
Cu	^{64}Cu	12,9 h	4,3	69	$6 \cdot 10^{-11}$
I	^{128}I	25 m	6,1	100	$6 \cdot 10^{-11}$
Na	^{24}Na	14,8 h	0,48	100	$1 \cdot 10^{-10}$

gleichmäßig bestrahlt würden. In vielen Fällen ist es überdies unmöglich, Flüssigkeiten zu bestrahlen, da diese durch die in den Bestrahlungsanlagen auftretende Wärme verdampfen bzw. von der intensiven Bestrahlung in H_2 und O_2 zerlegt werden, so daß die Gefäße, in denen bestrahlt wird, platzen. Die Qualität der Ergebnisse hängt außerdem von der Reinheit des mitbestrahlten Standardpräparates ab. Schließlich besteht die Gefahr, daß die zur radiometrischen Analyse benutzte radioaktive Atomart auf verschiedenen Wegen entsteht und damit nicht mehr als Maß für das zu bestimmende Element anzusehen ist. So kann z. B. ^{76}As durch die fünf in der Tabelle 2 aufgeführten Kernreaktionen im Uranreaktor entstehen.

Tabelle 2

$^{75}_{33}\mathrm{As}\ (n,\ \gamma)\ ^{76}_{33}\mathrm{As}$

$^{76}_{34}\mathrm{Se}\ (n,\ p)\ ^{76}_{33}\mathrm{As}$

$^{79}_{35}\mathrm{Br}\ (n,\ \alpha)\ ^{76}_{33}\mathrm{As}$

$^{74}_{32}\mathrm{Ge}\ (n,\ \gamma)\ ^{75}_{32}\mathrm{Ge} \xrightarrow{\beta} {}^{75}_{33}\mathrm{As}\ (n,\ \gamma)\ ^{76}_{33}\mathrm{As}$

$^{76}_{34}\mathrm{Se}\ (\gamma,\ p)\ ^{75}_{33}\mathrm{As}\ (n,\ \gamma)\ ^{76}_{33}\mathrm{As}$

$^{77}_{34}\mathrm{Se}\ (\gamma,\ p)\ ^{76}_{33}\mathrm{As}$

Vergleicht man das, was die drei genannten Methoden zu bieten vermögen, so läßt sich erkennen, welche Bedeutung die Radio-Indikatorenmethode für die analytische Chemie im allgemeinen und die Mikrochemie im besonderen hat. Die Radiometrie ist nicht weniger vielseitig und anpassungsfähig als z. B. die Kolorimetrie. Sie zeichnet sich aber durch höhere Spezifität aus. Es wird sicher in erster Linie ihre Aufgabe bleiben, spezielle, einmalig auftretende Probleme zu lösen, für die andere Methoden nicht ausgearbeitet sind oder die sich anderweitig nicht bearbeiten lassen. Man geht aber sicher nicht fehl, anzunehmen, daß die quantitative Analyse mit Hilfe radioaktiver Indikatoren ihren Weg aus den Laboratorien der Forschung auch in die Praxis finden wird.

Zusammenfassung

Alle Verfahren der quantitativen Analyse mit Hilfe radioaktiver Atomarten beruhen auf der von *Hevesy* und *Paneth* eingeführten Radio-Indikatorenmethode. Das von diesen Autoren erdachte Analysenverfahren hat heute besondere Bedeutung für organisch-analytische Fragen, wie sie z. B. in der Pharmakologie auftreten. Die Verdünnungsanalyse kann unter Umständen auch für Reihenanalysen wertvoll sein. Die Radioaktivierungsmethode schließlich eignet sich hervorragend zur quantitativen Spurenanalyse anorganischer Ionen. Alle drei Verfahren zeichnen sich durch hohe Empfindlichkeit und große Spezifität aus. Sie sind vielseitig und anpassungsfähig.

Summary

All procedures of quantitative analysis involving the use of radioactive species of atoms are based on the radio—indicator methods introduced by *Hevesy* and *Paneth*. The analytical procedure devised by these authors is

of special importance at present with respect to organic—analytical problems, such as are encountered for instance in pharmacology. Likewise, dilution analysis can be of value in series analyses under some circumstances. Finally, the radio activation method is excellently suited for the quantitative trace analysis of inorganic ions. All three procedures are characterized by high sensitivity and great specificity. They are versatile and adaptable.

Résumé

Toutes les techniques d'analyse quantitative qui font appel à des atomes radioactifs sont fondées sur la méthode des radio-indicateurs introduite par *Hevesy* et *Paneth*. Le procédé analytique imaginé par ces auteurs présente aujourd'hui une importance particulière pour les questions d'analyse organique qui se posent en pharmacologie par exemple. Dans certaines conditions, l'analyse par dilution peut être précieuse même pour les analyses de séries. Finalement, la méthode de radioactivation est particulièrement appropriée à l'analyse quantitative de traces d'ions minéraux. Ces trois méthodes se distinguent par leur sensibilité élevée et leur grande spécificité. Elles sont universelles et facilement adaptables.

Literatur

[1] *G. v. Hevesy* und *F. A. Paneth*, Z. anorg. Chem. **82**, 323 (1913).
[2] *A. J. Freeman* und *D. N. Hume*, Analyt. Chemistry **22**, 932 (1950).
[3] *G. E. Boyd*, Analyt. Chemistry **21**, 335 (1949).
[4] *W. Herr*, Z. Naturforsch. **8a**, 305 (1953); **9a**, 907 (1954); im Druck.

Institut du Radium, Paris

Anorganische Papierchromatographie

Von

Michael Lederer

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 15. März 1955)

I. Über die chemische Basis der Trennungsvorgänge

Die große Anzahl der veröffentlichten theoretischen Arbeiten in den verschiedenen Gebieten der anorganischen Chromatographie erlaubt schon, einige wichtige allgemeine Prinzipien zu erkennen. Es ist weiterhin möglich, dieselben Prinzipien bei Ionenaustausch- und Verteilungschromatographie sowie bei der Papierelektrophorese festzustellen, und man kann oft Angaben einer Methode für die Entwicklung einer anderen verwenden.

Die anorganischen papierchromatographischen Trennungsmethoden können in drei Hauptgruppen behandelt werden:

(i) Trennungen mit Lösungsmitteln, die starke Säuren enthalten;

(ii) Trennungen mit Lösungsmitteln, die schwache Säuren, Basen oder Komplexbildner enthalten;

(iii) Trennungen unter Bedingungen, die wir als „Non-equilibrium"-Konditionen bezeichnen möchten.

Jede dieser Gruppen könnte noch in zwei Teile geteilt werden, je nach der Polarität der verwendeten Lösungsmittel und den damit durchgeführten Trennungen, die auf Polaritätsdifferenzen und nicht auf Komplexbildung beruhen.

(*i*) *Die Trennungsmethoden mit Lösungsmitteln, die starke Säuren enthalten, haben folgende Merkmale:*

a) Die R_f-Werte bleiben konstant sogar bei unwägbaren Mengen radioaktiver Isotope. Dies wurde mit zahlreichen Lösungsmitteln, z. B. Aceton-HCl, Butanol-HCl, Phenol-HCl und Butanol-HNO_3, sowie mit zahlreichen Metallen Na, Cs, Zn, Co, Fe, Pd, Pt, Sn, Ba und Bi bei der

Darstellung trägerfreier Isotope[1–3] bestätigt. Für die Mikrochemie ist dies von Wichtigkeit, da es ermöglicht, minimale Mengen mittels Papierchromatographie zu isolieren, die vielleicht erst bei Irradiation mit Neutronen oder ähnlichen Methoden nachweisbar sind.

b) Ionenaustauscheigenschaften des Papiers sind in Gegenwart der starken Säure völlig unterdrückt. Durch Vergleiche eines mit dem Kationaustauscher Dowex-50 imprägnierten Papiers[4] mit gewöhnlichem Whatman No. 1 konnten wir in zahlreichen Fällen keine R_f-Wertunterschiede konstatieren.

Dagegen ist der Ionenaustausch bei Lösungsmitteln mit schwachen Säuren oder Komplexbildnern genügend groß, um die Trennungen trägerfreier Isotope zu verändern, wie *Frierson* et al.[5] mit Zn und As und wir[6] mit Cer und Yttrium konstatiert haben. Ähnlich verhält es sich auch mit Trennungen, die ohne Gleichgewicht, das heißt, in ungesättigter Atmosphäre ausgeführt werden.

Da die Gegenwart der starken Säure Nebeneffekte unterdrückt, ist es möglich, in solchen Fällen die Angaben der Ionenaustauschstudien sowie der Lösungsmittelverteilung und der Papierelektrophorese für die Ausarbeitung papierchromatographischer Methoden zu verwenden.

Es werden jetzt einige Beispiele angeführt, wie dieselbe differentielle Komplexbildung zur analytischen Trennung verwendet wird:

In 6-n Salzsäure ist Fe(III) als Anion des Typs $FeCl_4^-$ vorhanden, während Al(III) als Kation vorliegt. Zur Trennung von Fe(III) und Al(III) wurden die folgenden Methoden verwendet:

1. Extraktion mit Äther aus wäßriger 6-n Salzsäure: $HFeCl_4$ wird zu 99% extrahiert; Al(III) bleibt in der wäßrigen Phase.

2. Papierchromatographie mit Butanol, das mehr als 3-n Salzsäure enthält, trennt Fe(III) von Al(III). In diesem Fall ist schon in 3-n Salzsäure genügend $FeCl_3$ vorhanden, um eine R_f-Differenz zu verursachen, weil in alkoholischer Lösung die Hydratation von Fe(III) geringer ist als in einer wäßrigen Phase.

3. Adsorption des Al(III) auf Kationenaustauschern (z. B. Dowex-50), während Fe(III) mit 6- bis 12-n HCl eluiert wird.

4. Adsorption des $FeCl_4^-$ auf Anionenaustauschern (z. B. Dowex-1) aus 6-n HCl; Al(III) läuft durch.

5. Papierelektrophorese wäre möglich, doch ist die praktische Ausführung mit 6-n HCl wegen hoher Stromstärke ausgeschlossen.

Hiermit ist die Angabe, daß in 6-n Salzsäure Fe(III) als Anion vorliegt, genügend, um alle erwähnten Trennungen vorauszusehen.

Ähnliche Analogien zwischen Anionenaustauschtrennungen und Papierchromatographie existieren für eine Anzahl anderer Metalle: Die Trennung Pt(IV)-Ir(IV) ist mit beiden Methoden unmöglich, dagegen die

Trennung Pt(IV)-Ir(III) mit beiden ausführbar. Trennungen, wie Al—In—Tl, verlaufen in der gleichen Reihenfolge auf Dowex-1, wo Al als erstes eluiert wird, und mit Butanol—1-n HCl auf Papier, wo Al am wenigsten wandert.

Für alle angeführten Trennmethoden ist eben nur das Verhalten der Ionen in Salzsäure verschiedener Konzentrationen von Wichtigkeit. Die Alkalien, Erdalkalien und die Metalle der Gruppe III mit Ausnahme von Be und Sc zeigen überhaupt keine Tendenz, Komplexe zu bilden, bleiben in der Papierchromatographie bei $R_f = 0$ bis 0,15 und werden von Dowex-1-Kolonnen nicht adsorbiert. Sehr stark komplexgebundene Ionen, wie $PtCl_6^{--}$, $TlCl_4^-$, $AuCl_4^-$, $PdCl_4^{--}$ und $BiCl_4^-$, bleiben bei allen Verdünnungen von HCl anionisch[7]. R_f-Wertverschiebungen und Elutionssequenzverschiebungen sind nur durch radikale Änderungen des Lösungsmittels oder der Austauschgleichgewichte möglich. Schließlich gibt es noch eine wichtige Gruppe, zu der Fe(III), Ga(III), Co(II), Cu(II) usw. gehören, die mit steigender HCl-Konzentration mehr komplexiert werden. Ein typisches Gleichgewicht ist das von Fe(III):

$$Fe^{+++} \rightleftharpoons FeCl^{++} \rightleftharpoons FeCl_2^+ \rightleftharpoons FeCl_3^0 \rightleftharpoons FeCl_4^-$$

oder das von Cu(II)

$$Cu^{++} \rightleftharpoons CuCl^+ \rightleftharpoons CuCl_2^0 \rightleftharpoons CuCl_3^- \rightleftharpoons CuCl_4^{--}.$$

Wenn, wie im Falle von Cu(II), zwei verschiedene Anionkomplexe möglich sind, existiert auch meistens ein Extraktions- bzw. Adsorptionsmaximum bei einer bestimmten HCl-Konzentration.

Die Arbeiten von *Kraus* und *Moore*[7] behandeln dieses Thema für den Anionenaustausch mit Dowex-1. Die Metalle Zn(II), Cu(II) und Co(II) weisen scharfe Maxima bei 2-n, 6-n bzw. 8-n Konzentration auf, während Fe(III) mit steigender HCl-Konzentration mehr adsorbiert wird.

Die Arbeit von *Reeves* und *Crumpler*[8] enthält die R_f-Werte derselben Metalle mit Butanol, dem 15, 20, 25 und 30% 12-n HCl zugesetzt wurden. Die Reihenfolgen der beiden Untersuchungen sind beinahe identisch, dagegen wandert Zn(II) nicht langsamer auf dem Papier bei höheren HCl-Mengen, während die Gegenwart von mehr HCl in der Lösung das Ion $ZnCl_4^-$ vom Austauscher verdrängt. Siehe Abb. 1.

Nun noch einige Bemerkungen über polare Lösungsmittel in der Papierchromatographie. Die Alkalien können mit Methanol[9], Äthanol-Wasser-Mischungen[10] sowie mit Äthanol-Methanol[11] getrennt werden. Die Reihenfolge, ob als Chloride[9–11] oder als Acetate[12], ist immer die der Ionenpotentiale Li—Na—K, während Rb und Cs sowohl voneinander als von K schwer trennbar sind. Mit Erdalkalien kann man dieselben Folgen bei Acetaten[12], Chloriden und Rhodaniden[6, 9] konstatieren. Obwohl Komplexbindung in einigen Fällen wichtig ist, ist der Trenneffekt immer

von dem Wassergehalt der Lösungsmittel abhängig, wie wir bei der Trennung von Ra und Ba gezeigt haben[6]. Wieder sind analoge Trennungen mit Ionenaustauschern möglich, wie aus Arbeiten von *Rieman* et al.[13] sowie anderen[14] ersichtlich ist.

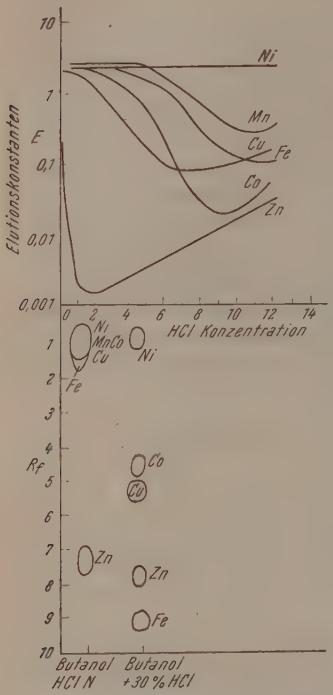


Abb. 1. Elutionskonstanten auf Dowex-1 verglichen mit R_f-Werten mit Butanol-HCl-Gemischen

(ii) *Trennungen mit Lösungsmitteln, die schwache Säuren, Basen oder Komplexbildner enthalten.*

Hier ist nur zu bemerken, daß im Ganzen dieselben Prinzipien, d. h. Extraktion unter Gleichgewicht zwischen freien und komplexierten Ionen, die Trenneffekte leiten. Die Arbeiten von *Pollard*, *McOmie* et al.[15] zeigen besonders, wie Trennungen mit verschiedenen Komplexbildnern, z. B. Acetylaceton, ausgearbeitet werden können. Die Trennungsmöglichkeiten werden natürlich durch die große Auswahl der organischen Verbindungen gesteigert. Dagegen sind die Trennungen oft bei großen Konzentrationsunterschieden der zu trennenden Mischung unverläßlich und vor allem die R_f-Werte leicht beeinflußt.

(iii) *Trennungen unter „Non-equilibrium"-Konditionen.*

Als typischen Fall nehmen wir die Extraktion von UO_2^{++}, das von einem nassen aufgetragenen Fleck am Papier mit trockenem Äther + 2% HNO_3 extrahiert wird. Da das Uran mit der Lösungsfront wandert, d. h. vollkommen und ohne Adsorption vom Start ausgewaschen wird, erlaubt das Entwickeln auf trockenem Papier die irreversible Adsorption anderer Ionen. Auf diesem Wege wird eine Trennung erhalten, die viel besser ist als eine, wo ein Gleichgewichtsprozeß mit kalkulierbaren Verunreinigungen verwendet wird. Dagegen eignet sich dieses Verfahren nur für spezifische Extraktionen von einem Ion, möglicherweise von zwei Ionen mit zwei aufeinanderfolgenden Lösungsmitteln[16].

II. Einige neue Trennungen und Lösungsmittel

(i) Das Verhalten von Se(IV) und Te(IV) in verschiedenen Lösungsmitteln.

Eine Trennung von Se(IV) und Te(IV) wurde von *Burstall* et al.[9] unter „Non-equilibrium"-Konditionen durchgeführt. Wir haben in frühe-

ren Veröffentlichungen die Trennung Se-Te-Po mit Butanol—1-n HCl sowie die Trennung Se-Te mit Butanol+10% HNO_3 beschrieben. In beiden Lösungsmitteln wandern diese zwei Elemente ungefähr gleich: Te mit $R_f = 0{,}18$ und Se mit $R_f = 0{,}67$. Daraus wäre zu schließen, daß Te als Kation oder starkes Anion, aber Se als schwaches Anion (z. B. als H_2SeO_3) vorhanden ist. Se-Komplexe mit Chlor sind ausgeschlossen durch den gleichen R_f-Wert in dem Butanol—HNO_3-Gemisch. Durch Papierelektrophorese mit 0,5-n HCl konnte das kationische Verhalten von Te(IV) festgestellt, somit die Möglichkeit des starken Anions TeO_3^{--} ausgeschlossen werden. Dieses Verhalten von Te(IV) ist aber schwer mit anderen Eigenschaften vereinbar, wie z. B. seine Flüchtigkeit in kochender Salzsäure oder kochender Bromwasserstoffsäure.

Die Komplexchemie dieser zwei Elemente wurde erfolgreich durch Papierchromatographie untersucht, wo bei verschiedenen Lösungsmitteln und verschiedenen Säurekonzentrationen die folgenden Resultate verzeichnet werden konnten:

Butanol — HCl:

Für diese Versuche wurden je 100 mg von Na_2SeO_3 und Na_2TeO_3 in 10 ml 3-n Salzsäure aufgelöst. Mengen von ungefähr 0,02 ml wurden mittels eines Glasstabes auf Whatman-No. 1-Bogen 30 × 30 cm aufgetragen und nach der aufsteigenden Methode entwickelt. Tabelle 1 gibt die R_f-Werte mit Butanol—Wasser und Butanol, das mit verschiedenen Konzentrationen von HCl gesättigt wurde, an.

Tabelle 1

Lösungsmittel	Butanol Wasser	Butanol 1-n HCl	Butanol 1,5-n HCl	Butanol 2-n HCl	Butanol 3-n HCl
Se(IV)	0,57	0,67	0,64	0,71	0,78
Te(IV)	0,15	0,18	0,31	0,47	0,67

Butanol — Salpetersäure:

Natriumselenit und -tellurit wurden in 1,5-n HNO_3 gelöst. Sonst wurde dieselbe Methode wie oben verwendet. In Tabelle 2 sind die R_f-Werte in Butanol+wäßriger HNO_3 verzeichnet.

Tabelle 2

Lösungsmittel	Butanol Wasser	Butanol 1,5-n HNO_3	Butanol 3-n HNO_3
Se(IV)	0,54	0,59	0,69
Te(IV)	0,004	0,15	0,18

Butanol — Bromwasserstoffsäure:

Für die Versuche mit HBr wurden die obenerwähnten Natriumsalze in 0,85-n HBr gelöst. Die R_f-Werte sind in Tabelle 3 verzeichnet.

Tabelle 3

Lösungsmittel	Butanol 10% HBr	Butanol 20% HBr
Se(IV)	0,64	0,73
Te(IV)	0,46	0,92

Butanol — Schwefelsäure- und Butanol — Phosphorsäure-Gemische:

Im Gemisch Butanol-Schwefelsäure-Wasser (100:10:90) wandert Se(IV) mit der Säurefront und Te(IV) bleibt bei $R_f = 0{,}1$. Mit Butanol-Phosphorsäure-Wasser (100:20:80) wandert Se(IV) mit $R_f = 0{,}58$ und Te(IV) mit $R_f = 0{,}026$.

Für eine leichtere Deutung dieser Resultate wurde die graphische Darstellung 2 angefertigt. In Butanol—HNO_3-Mischungen steigen die

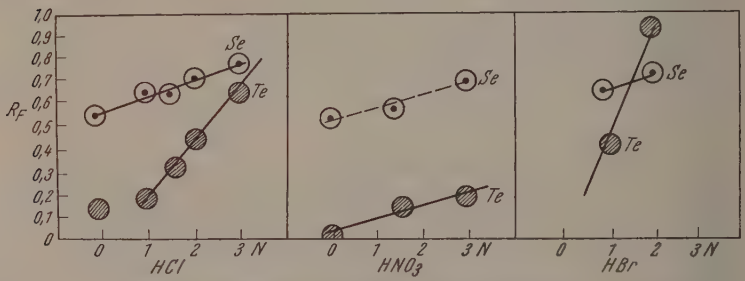


Abb. 2. R_f-Werte von Selenit und Tellurit mit Gemischen von Butanol und Säuren

R_f-Werte von Se und Te mit steigender Säuremenge gleichmäßig an. Dies ist auf den steigenden Wassergehalt der beweglichen Phase zurückzuführen. In Butanol — HCl und Butanol — HBr steigen die R_f-Werte von Se um ungefähr denselben Wert. Hieraus ist zu schließen, daß Se(IV) als das gleiche Ion in allen untersuchten Lösungsmitteln vorliegt; das heißt, der Verteilungskoeffizient ist nicht durch die Konzentration und die Qualität des im Lösungsmittel gegenwärtigen Anions beeinflußt. Dagegen ist der Einfluß von HCl und HBr auf den R_f-Wert von Te um so markanter. Hiermit ist der Übergang des Te(IV) von einer kationischen Form in verdünnter HCl, HNO_3, HBr, H_2SO_4 und H_3PO_4 zu einer kovalenten Form etwa $TeCl_4$ oder $TeBr_4$ bei höheren HCl- und HBr-Konzentrationen

anzunehmen, wie auch schon die Flüchtigkeit in konz. HCl oder HBr gezeigt hat. Se(IV) scheint in allen untersuchten Lösungen als H_2SeO_3 zu existieren.

Die hier erhaltenen Daten können für die Ausarbeitung anderer Trennmethoden verwendet werden. Wenn aus irgendeinem Grund eine Trennung in HCl oder HBr erfolgen soll, muß die Konzentration dieser Säuren sehr niedrig gehalten werden, gleich ob man Ionenaustausch, Extraktion mit einem Lösungsmittel oder Papierelektrophorese zu verwenden beabsichtigt. Mit 5% HBr als Elektrolyt haben wir dies bei der Papierelektrophorese bestätigt, wo mit 150 Volt Se(IV) in zwei Stunden nicht wandert, während Te(IV) sich 16 mm in der Richtung zur Kathode bewegt.

Einige andere Elemente könnten auch interessante analytische Daten mit ähnlichen Studien liefern, z. B. hat *Hecht*[17] mit Butanol — 10% HNO_3 und Butanol — 10% HBr und wir[18] mit Butanol — 10% HCl denselben R_f-Wert für Ge(IV) ($R_f = 0{,}26$) gemessen. Da $GeCl_4$ und $GeBr_4$ in konzentrierten Säuren destillierbar sind, scheint eine R_f-Wertverschiebung mit höheren Säurekonzentrationen gegeben und für Trennungen von anderen Elementen von Interesse zu sein.

(ii) Trennungen von K-Rb-Cs.

Vor einiger Zeit hat *Steel*[19] die Trennung von K-Rb-Cs mit Phenol, das mit 2-n HCl gesättigt ist, ausgearbeitet. Dieses Lösungsmittel weist bessere R_f-Wertunterschiede als früher vorgeschlagene Mischungen (*Miller* und *Magee*[20]) auf; außerdem konnten wir mit ^{131}Cs nachweisen, daß Trennungen

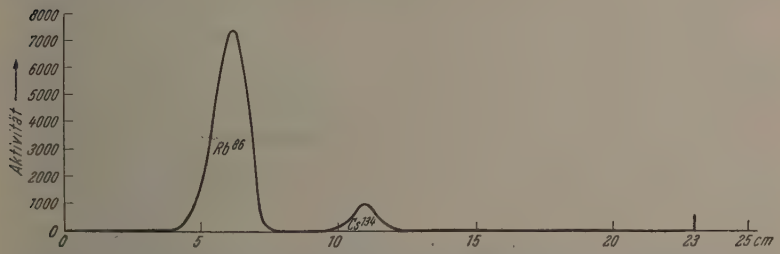


Abb. 3. Trennung Rb-Cs Ein chemisch „reines" Rubidium-Chlorid wurde mit Neutronen bombardiert und mit Phenol + 2-n HCl chromatographiert. Die kleine Aktivität entspricht ^{134}Cs, das komplett von ^{86}Rb getrennt ist

auch mit unwägbaren Mengen möglich sind[23]. Hiermit war es uns ermöglicht, mit Mme *Laberrigue*[21] ein radiochemisch reines Rb-Präparat herzustellen. Versuche von *Emery* et al.[22] in derselben Richtung, aber mit Umkristallisation des Tartrats als Trennungsmethode konnte nach sieben Umkristallisationen das ^{134}Cs nur auf 0,05% herabsetzen, dagegen konnte

das chromatographisch gewonnene ^{86}Rb als vollkommen rein betrachtet werden, wie auch Abb. 3 zeigt.

Da die Herstellung von reinen Rb- und Cs-Salzen auch noch für andere Zwecke von Interesse ist, haben wir die Messung der R_f-Werte einer großen Anzahl von Ionen mit Phenol + 2-n HCl unternommen. Tabelle 4

Tabelle 4. R_f-Werte in Phenol-2n-HCl

Ion	R_f-Wert	Ion	R_f-Wert	Ion	R_f-Wert
Cs^+	0,52	Cu^{++}	0,025	UO_2^{++}	0,01
Rb^+	0,26	Bi^{+++}	0,015	Th^{IV}	0,0
K^+	0,19	Hg^{++}	0,045	Zr^{IV}	0,022
Ba^{++}	0,0	Cd^{++}	0,0	Ti^{IV}	0,0
Sr^{++}	0,0	Pb^{++}	0,0	D^V	0,0
Ca^{++}	0,0	As^{+++}	0,30	Al^{+++}	0,0
Mg^{++}	0,0	Sb^{+++}	0,26	Cr^{+++}	0,0
Ag^+	0 bis 0,68	Sn^{++}	0,28	La^{+++}	0,0
	Komet	Fe^{+++}	0,01	Seltene	0,0
Tl^+	0,56 Komet	Co^{++}	0,018	Erden	
Au^{+++}	0,24	Ni^{++}	0,0	SeO^{9--}	0,23
Pd^{++}	0,0	Zn^{++}	0,038	TeO^{9--}	0,06
Pt^{IV}	0,0	Mn^{++}	0,0	MoO_4^{--}	0,0

zeigt die R_f-Werte der Ionen. Die einzigen metallischen Verunreinigungen wären hiermit Ag und Tl, die aber mit anderen Methoden leicht abzutrennen sind.

Für die Darstellung von trägerfreiem ^{131}Cs von in Harwell mit Neutronen bestrahltem $BaCl_2$ waren die folgenden radioaktiven Nuklide zu trennen: ^{131}Ba, ^{32}P und ^{34}S. Durch Umkristallisation in konz. HCl wurde das meiste Ba gefällt. ^{32}P und ^{34}S wurden durch wiederholtes Einengen mit Königswasser in Orthophosphat und Sulfat verwandelt. Mit Phenol + 2-n HCl bleiben Ba und S am Start, während ^{32}P mit dem Cs wandert. Die Zone des Cs wurde dann mit verdünnter Salzsäure ausgewaschen, auf einige Tropfen eingeengt und auf einem neuen Bogen Papier mit Butanol + 1-n HCl entwickelt, womit sich eine Trennung (Cs: $R_f = 0{,}1$, PO_4^{---}: $R_f = 0{,}7$) ergibt. Durch Anwendung von zwei Lösungsmitteln scheint es hiermit möglich, absolut reine Rb- und Cs-Präparate mit Phenol + 2-n HCl zu erhalten.

(iii) Chromatographie mit Butanol—Schwefelsäure- und Butanol—Phosphorsäure-Gemischen.

In früheren Arbeiten[23] wurden R_f-Werte in Butanol—HCl-, —HBr und $-HNO_3$-Gemischen für zahlreiche Ionen angegeben. Nach den Überlegungen im ersten Teil dieser Mitteilung wäre die Ausarbeitung von

Lösungsmitteln, die eine noch kleinere Tendenz zur Komplexbildung haben, von gewissem Interesse für die Trennung von Anionen und Kationen. Für diesen Zweck wurden die Lösungsmittel Butanol-Schwefelsäure-Wasser (100 : 10 : 90) und Butanol-o-Phosphorsäure-Wasser (100 : 20 : 80) untersucht. Abb. 4 und 5 zeigen die erhaltenen R_f-Werte.

Mit Ausnahme von U(VI) bleiben alle gewöhnlichen metallischen Ionen wie erwartet in der Zone $R_f = 0$ bis 0,1. Bei U(VI) haben wir mit *Bachelet* und *Claude*[24] die Bildung anionischer Verbindungen in Sulfat- und Phosphatlösungen durch Papierelektrophorese nachgewiesen. Hingegen sind Trennungen, wie Zn — PO_4^{---}, leicht durchführbar, die in Butanol—HCl untrennbar sind. Hg(II) wandert auch in Butanol + H_2SO_4, aber hier scheinen die Spuren von Chloriden, die in ungereinigtem Papier vorhanden sind, für die Bildung von $HgCl_2$ verantwortlich zu sein.

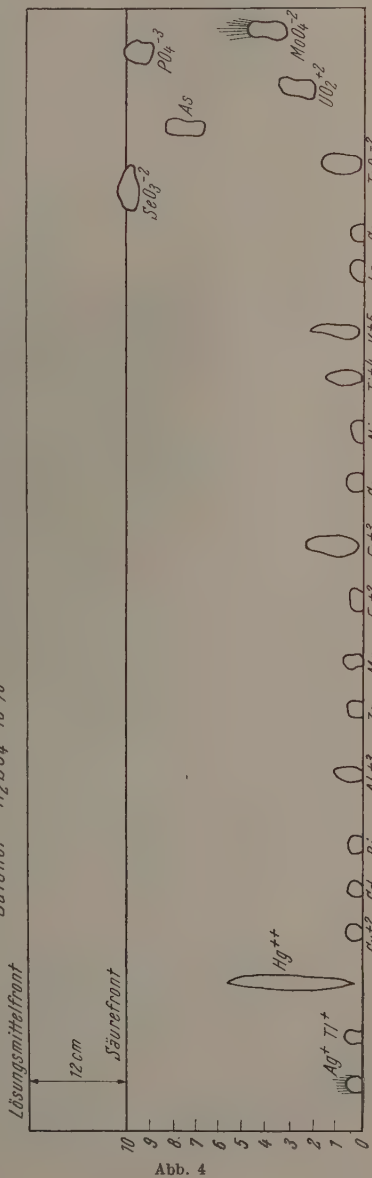


Abb. 4

Zusammenfassung

Die Methoden der papierchromatographischen Trennung der Kationen lassen sich je nach Art des verwendeten Lösungsmittels wie folgt einteilen:

1. Trennungen mit einem Lösungsmittel, das eine starke Säure enthält;

2. Trennungen mit einem Lösungsmittel, das eine schwache Säure, eine schwache Base oder ein komplexbildendes Reagens enthält;

3. Trennungen unter den Bedingungen des Ungleichgewichtes.

Im Hinblick auf neu auszuarbeitende Trennungen wird berichtet:

1. über das Verhalten der Ionen von Se(IV) und Te(IV);

2. über die Trennung der Radioelemente ^{131}Cs und ^{86}Rb mit Hilfe von mit 2-n Salzsäure gesättigtem Phenol als Lösungsmittel;

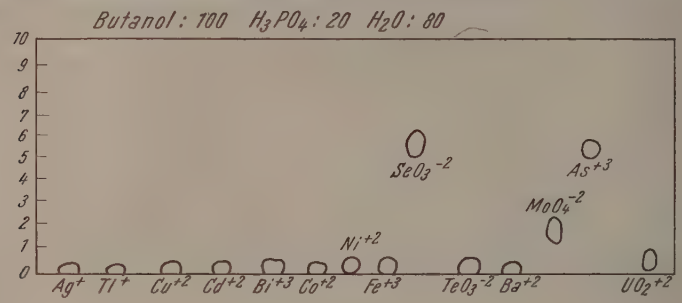


Abb. 5

3. über die Messung der R_f-Werte mehrerer Ionen mit Hilfe von mit Schwefelsäure oder Phosphorsäure gesättigtem Butanol als Lösungsmittel.

Summary

I. With respect to the chemical basis of separations:

The paper chromatographic methods for cations may be divided according to the nature of the solvent:

1) The separations with a solvent containing a strong acid

2) The separations with a solvent containing a weak acid, a weak base, or a complexing agent

3) The separations under "non-equilibrium" conditions.

II. Some new separations:

1) A study was made of the behavior of the ions Se(IV) and Te(IV) in various solvents.

2) The separation of the radio elements ^{131}Cs and ^{86}Rb has been accomplished with phenol saturated with 2 *N* HCl as solvent

3) The R_f values of several ions has been measured, employing as solvent butanol saturated with sulfuric acid or phosphoric acid.

Résumé

I. Sur la base chimique des séparations.

On peut diviser les méthodes de la chromatographie sur papier des cations d'après la nature du solvant:

(i) Les séparations avec un solvant contenant un acide fort.

(ii) Les séparations avec un solvant contenant un acide faible, une base faible ou un complexant.

(iii) Les séparations sous les conditions «Non-equilibrium».

II. Quelques séparations nouvelles:

(i) On a étudié le comportement des ions Se(IV) et Te(IV) dans divers solvants.

(ii) La séparation des radioéléments ^{131}Cs et ^{86}Rb a été effectué avec comme solvant le phenol saturé de HCl 2N.

(iii) On a mesuré les valeurs de R_f de plusieurs ions avec comme solvant le butanol saturé de l'acide sulfurique ou de l'acide phosphorique.

Literatur

[1] *M. Lederer*, Analyt. Chim. Acta **8**, 134 (1953).

[2] *M. Lederer*, Analyt. Chim. Acta **11**, 528 (1954).

[3] *G. Bouissières* und *M. Lederer*, Bull. soc. chim. France **1952**, 904.

[4] *M. Lederer*, Analyt. Chim. Acta **12**, 142 (1955).

[5] *W. J. Frierson, S. L. Hood, I. B. Whitney* und *C. L. Comar*, Arch. Biochem. Biophysics **38**, 397 (1952).

[6] *M. Lederer*, Thèse de doctorat, Paris, 1954.

[7] *K. A. Kraus* und *G. E. Moore*, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 1457, 1460 (1953). *K. A. Kraus, F. Nelson* und *G.W. Smith*, J. Physic. Chem. **58**, 11 (1954).

[8] *W. A. Reeves* und *T. B. Crumpler*, Analyt. Chemistry **23**, 1576 (1951).

[9] *F. H. Burstall, G. R. Davies, R. P. Linstead* und *R. A. Wells*, J. Chem. Soc. London **1950**, 516.

[10] *S. Chakrabarti* und *D. P. Burma*, Science and Culture **16**, 485 (1951).

[11] *T. Barnabas, M. G. Badve* und *J. Barnabas*, Naturwiss. **41**, 478 (1954).

[12] *H. Erlenmeyer, H. v. Hahn* und *E. Sorkin*, Helv. Chim. Acta **34**, 1419 (1951).

[13] *M. Lerner* und *W. Rieman*, Analyt. Chemistry **26**, 610 (1954). *R. C. Sweet, W. Rieman* und *J. Beukenkamp*, Analyt. Chemistry **24**, 952 (1952).

[14] *E. R. Tompkins, J. X. Khym* und *W. E. Cohn*, J. Amer. Chem. Soc. **69**, 2769 (1947).

[15] *F. H. Pollard* und *J. F. W. McOmie*, Chromatographic Methods of Inorganic Analysis. London: Butterworths. 1953.

[16] *A. F. Williams*, J. Chem. Soc. London **1952**, 3155.

[17] *I. M. Ladenbauer, L. K. Bradacs* und *F. Hecht*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 388. *I. M. Ladenbauer* und *F. Hecht*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 398.

[18] *M. Lederer*, Analyt. Chim. Acta **11**, 132 (1954).

[19] *A. E. Steel*, Nature **173**, 315 (1954).

[20] *C. C. Miller* und *R. J. Magee*, J. Chem. Soc. London **1951**, 3183.

[21] *M. Lederer* und *Laberrigue*, im Druck.

[22] *E. W. Emery, J. E. S. Bradley* und *N. Veall*, Nature **175**, 34 (1955).

[23] *E. Lederer* und *M. Lederer*, Chromatography. A Review of Principles and Applications. Amsterdam: Elsevier. 1953.

[24] *M. Bachelet, R. Claude* und *M. Lederer*, C. r. acad. sci., Paris **240**, 419 (1955).

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien

Mikroelektrophorese

Von

H. Michl

Mit 7 Abbildungen

(Eingelangt am 30. März 1955)

Bewegt sich in einer Lösung der gelöste Stoff unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes, so wird dieser Vorgang bei niedrigmolekularen Stoffen als Ionophorese, bei hochmolekularen Stoffen als Elektrophorese bezeichnet[1]. Die Geschwindigkeit, mit der sich ein geladenes Teilchen im elektrischen Feld bewegt, ist proportional der Stärke des Feldes und liegt in der Größenordnung von 10^{-4} cm/sek bei einem Spannungsgefälle 1 V/cm. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens hängt vor allem von seiner Ladung und in geringerem Maße von seiner Größe und Gestalt ab. Diese Gesetzmäßigkeiten kennt man schon länger als 100 Jahre, sie wurden zuerst von *Wiedemann*[2] und etwas später von *Quincke*[3] veröffentlicht. Wie man aus Hinweisen in den genannten Arbeiten entnehmen kann, war damals die Erscheinung der Elektrophorese schon längere Zeit bekannt, als erster dürfte sie *Reuss* 1808[4] beobachtet haben.

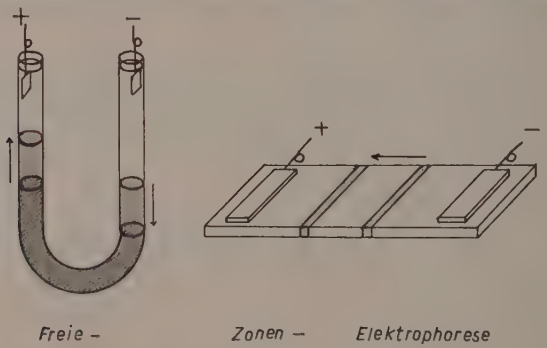


Abb. 1

Elektrophoretische Untersuchungen sind ursprünglich überhaupt nur zum Studium der elektrokinetischen Erscheinungen, zu denen die Elektrophorese ja gehört, durchgeführt worden[5]. Das ist lange Zeit so geblieben. Ich kann allerdings auf diese interessanten Untersuchungen nicht näher eingehen, da das Thema meines Vortrages die Methodik der analytischen Anwendungen der Elektrophorese behandeln soll. Diese sind erst seit den Arbeiten von *Tiselius*[6] 1938 Allgemeingut geworden, wenn auch schon früher vereinzelt elektrophoretische Methoden zur Auftrennung von Substanzgemischen verwendet worden sind.

Zur Zeit werden für analytische Untersuchungen hauptsächlich zwei Anordnungen bevorzugt: die freie Elektrophorese mit wandernden Fronten und die Zonenelektrophorese (Abb. 1). Überführungsmethoden[7] und die Beobachtung der elektrophoretischen Bewegung einzelner Teilchen unter dem Mikroskop[8] werden zur Zeit für Trennungen kaum verwendet.

Die freie Elektrophorese erfolgt im Prinzip in einem U-Rohr, das mit Puffer gefüllt ist. Auf dem Boden dieses U-Rohres befindet sich die Lösung der zu untersuchenden Substanz. Legt man nun an dieses U-Rohr eine elektrische Spannung, so beginnt die Substanz je nach ihrer Beweglichkeit mehr oder weniger schnell zu wandern, und zwar wandert sie in einem Schenkel eine bestimmte Strecke hinauf, im andern annähernd die gleiche Strecke hinunter. Hat man ein Gemisch mehrerer Substanzen mit verschiedenen Beweglichkeiten, so tritt demnach in beiden Schenkeln eine partielle Entmischung ein.

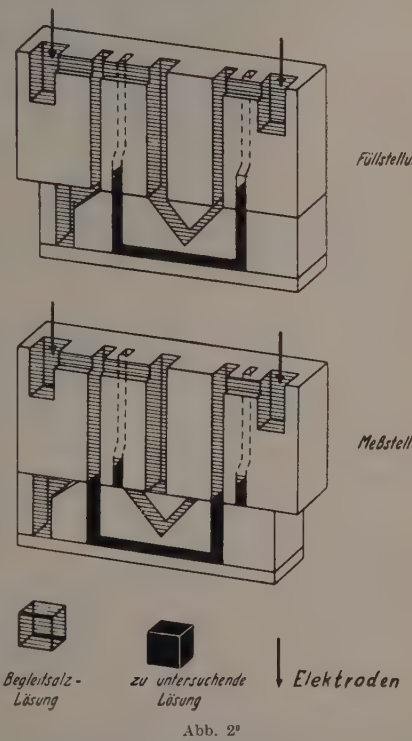


Abb. 2[9]

Dieses einfache U-Rohr wird jetzt natürlich nicht mehr verwendet. Den Querschnitt durch eine moderne Apparatur[9] zeigt Abb. 2. Die wesentlichsten Unterschiede gegenüber dem alten U-Rohr sind, daß die Elektrodenräume von dem eigentlichen Elektrophoreseraum getrennt

sind, damit das Untersuchungsmaterial nicht durch Elektrolyseprodukte verunreinigt wird. Ferner ist es sehr wichtig, daß man eine scharfe Grenze zwischen Untersuchungsmaterial und überstehendem Puffer herstellen kann. Das geschieht bei der gezeigten Apparatur durch horizontales Verschieben zweier Glasblöcke, die die Bohrungen für die zu untersuchenden Lösungen tragen.

Mit diesem Verfahren kann man hauptsächlich hochmolekulare Substanzen untersuchen, und zwar aus folgenden Gründen: Um das Auftreten von Störungen zu vermeiden, muß der Beitrag der Untersuchungssubstanz zur Gesamtleitfähigkeit möglichst gering sein, er soll etwa 1% nicht übersteigen[10]. Das heißt also, daß der Puffer, der das U-Rohr ausfüllt, eine möglichst hohe Konzentration und die Substanz eine möglichst geringe haben soll. Nun kann man aber die Ionenstärke des Puffers nicht beliebig groß machen, da sonst der Puffer eine zu hohe Leitfähigkeit bekommen würde und man wegen der zu großen Wärmeentwicklung nur ein niedriges Spannungsgefälle anlegen könnte. In der Praxis arbeitet man mit Ionenstärken von 0,1 bis 0,2. Bei der Untersuchung von niedrigmolekularen Stoffen dürfte deren Konzentration daher nicht größer als 0,001-n sein. Derartige Fronten sind instabil, sie werden in der zu einer Auftrennung notwendigen Zeit durch Konvektion und Diffusion zerstört[11].

Wesentlich günstiger liegen die Verhältnisse bei hochmolekularen Stoffen. Wegen der geringen Beweglichkeit und verhältnismäßig niedrigen Ladung kann man hier 1- bis 5%ige Lösungen verwenden. Die Grenzflächen sind infolge der kleinen Diffusionskonstanten dieser Stoffe in den zur Auftrennung notwendigen Zeiträumen weitgehend beständig.

Wie macht man nun die Phasengrenzfläche Protein: Puffer sichtbar? Normalerweise sind Proteinlösungen nicht gefärbt, auch der Nachweis mit Hilfe der UV-Absorption gibt bei Proteingemischen nur sehr unbefriedigende Resultate[12]. Seit den Arbeiten von *Tiselius*[6] verwendet man zum Nachweis solcher Phasengrenzen praktisch ausschließlich die Unterschiede des Brechungsindex zwischen Puffer und Proteinlösung. Es werden hiebei hauptsächlich zwei Anordnungen bevorzugt: 1. Methoden, die auf dem *Töpler*schen Schlierenverfahren beruhen und 2. Interferenzverfahren.

Die erste Anordnung findet hauptsächlich bei der Makroelektrophorese[13] Anwendung. Sie liefert in der Modifikation von *Longsworth*[14] Schattenkurven, die den Verlauf des Differentialquotienten dn/dx wiedergeben. Jedem Hügel der Kurve entspricht eine Komponente, die Fläche jedes Hügels ist unter bestimmten Voraussetzungen der Konzentration proportional. Bei dem Verfahren von *Lamm*[15] kann man eine analoge

Kurve zeichnerisch punktweise konstruieren, beim Verfahren von *Svensson* erhält man direkt eine Kurve, hell auf dunklem Grunde oder umgekehrt, die analog ausgewertet werden kann[16]. Der Kurvenverlauf kann während der gesamten Versuchszeit beobachtet und photographisch festgehalten werden. Pro Versuch benötigt man ca. 10 bis 100 mg Substanz.

Der Übergang zu Substanzmengen von ca. 1 mg pro Versuch veranlaßte die Einführung von interferometrischen Meßmethoden[17]. Diese liefern im Gegensatz zu den bisher besprochenen Verfahren, die Bilder des Differentialquotienten gegen die Küvettenhöhe geben, zunächst direkt den Verlauf des Berechnungsquotienten gegen die Küvettenhöhe, also das Integral der oben genannten Kurve. Bei dieser Anordnung kann man also die Konzentration direkt ablesen, hat aber den Nachteil, daß man die Trennung selbst viel schlechter sieht. Auf diesem Gebiet sind bisher eine ganze Anzahl meist sehr geistreicher Methoden vorgeschlagen worden, die eine optische Differenzierung bzw. eine gleichzeitige Aufzeichnung der Differential- und der Integralkurve ermöglichen sollen[18].

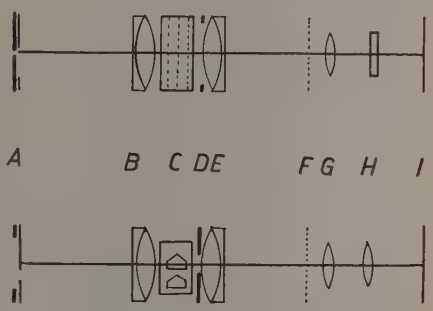


Abb. 3. Oben: Aufriß. Unten: Grundriß. *A*. Dicke Linie: Schnitt durch den horizontalen Spalt; dünne Linie: Schnitt durch den vertikalen Spalt. *B* und *E*. Schlierenobjektive. *C*. Zelle. *D*. Blende. *F*. Schräger Draht. *G*. Photographisches Objektiv. *H*. Zylinderlinse. *I*. Photographische Platte

Einen verhältnismäßig einfachen Strahlengang hiefür gibt *Svensson*[19] an. Abb. 3 zeigt ihn schematisch in Grund- und Aufriß. Hier sind zwei optische Systeme, von denen das eine die Differential- und das andere die Integralkurve ergibt, ineinander geschachtelt. Die Differentialkurve wird durch den von *Svensson* schon 1939 vorgeschlagenen Strahlengang erzeugt[16]: zu diesem gehört der hier links befindliche waagrechte Spalt (*A*), der von den beiden Linsen (*B*) und (*E*) auf dem schrägen Draht (*F*) abgebildet wird. Zwischen diesen beiden Linsen, die man als Schlierenobjektive bezeichnet, befindet sich nun die Küvette (*C*), in der die Auftrennung erfolgt. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten rechteckigen oder runden Küvetten, besitzt diese die Form eines Rechteckes mit aufgesetztem Dreieck. Zur Erzeugung der Differentialkurve dient der rechteckige Teil.

Befindet sich nun an einer Stelle der Küvette ein Brechungsgradient, so wird das Licht durch diesen nach unten abgelenkt und schneidet den schrägen Draht an einer anderen Stelle als das nicht abgebeugte Licht. Zwischen dem schrägen Draht (*F*) und der photographischen

Platte (*I*) befindet sich ein photographisches Objektiv (*G*) und eine Zylinderlinse (*H*). Beide sind so angeordnet, daß sie in der Horizontalen den schrägen Draht (*F*) auf der photographischen Platte (*I*) und in der Vertikalen die Küvette auf (*I*) abbilden. Durch das Zusammenwirken beider Abbildungsarten kommt nun die Gradientenkurve, die Abb. 4 zeigt, dunkel auf hellem Grund zustande. Dunkel auf hellem Grund deshalb, weil sie sozusagen den Schatten des Drahtes auf einer beleuchteten Wand darstellt.

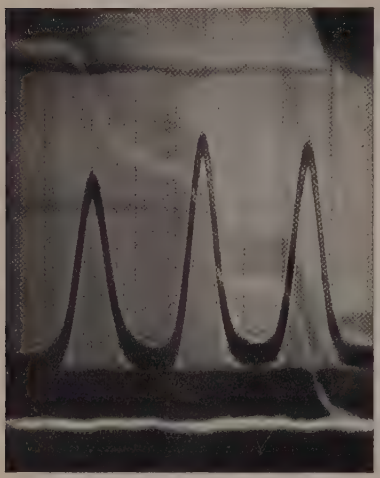


Abb. 4[19]

Zur undifferenzierten Abbildung des Brechungsverlaufes dient der Teil der Zelle, der als optisches Prisma wirkt. Er wird von einem vertikalen Spalt (*A*) ausgeleuchtet. Durch die Prismenform wird das Lichtbündel seitlich abgelenkt. Der Grad der Ablenkung hängt wie bei jedem Prisma vom Prismenwinkel und vom Brechungskoeffizienten des Prismenmaterials ab. Der Prismenwinkel ist nun naturgemäß über den ganzen Bereich konstant, der Brechungskoeffizient ändert sich jedoch in senkrechter Richtung. Es wird also das Lichtbündel an den Stellen, wo ein stärkerer Brechungskoeffizient vorhanden ist, stärker abgelenkt werden, wobei die Stärke der Ablenkung dem Brechungskoeffizienten proportional sein wird. Da nun, wie bereits bei der Besprechung des Strahlenganges der Differentialkurve gezeigt wurde, der von der Lichtquelle ausgeleuchtete Spalt (*A*) in seiner waagrechten Dimension auf dem schrägen Draht (*F*) durch die Zylinderlinse (*H*) abgebildet wird, wird auch der senkrechte Spalt (*A*) in seiner waagrechten Dimension auf der photographischen Platte (*I*) abgebildet. Da nun die Lichtstrahlen beim Durchtritt durch den dreieckigen Teil der Zelle verschieden stark abgelenkt werden, erhält man auf der photographischen Platte das gewünschte Bild des Brechungsgradienten.

Ein Interferenzverfahren verwendet auch die verbreitetste Apparatur — zur Zeit dürften mehrere hundert Apparate in Verwendung stehen — für freie Mikroelektrophorese. Diese Apparatur wurde von *Antweiler* entwickelt[9], sie benützt eine Interferometeranordnung nach *Jamin*[20]. Ich will sie wegen ihrer weiten Verbreitung genauer besprechen. Bei dieser Apparatur wird die Küvette in der entsprechenden Höhe mit einem

weißen Lichtstrahl von $0{,}05 \times 0{,}5$ mm Querschnitt abgetastet. Der tastende Lichtstrahl tritt mit einem zweiten kohärenten Lichtstrahl, der in einem Vergleichskanal läuft, in Interferenz. Wenn nun durch Konzentrationsunterschiede zwischen dem Meß- und Vergleichskanal Phasenverschiebungen der Lichtstrahlen hervorgerufen werden, kompensiert man sie durch eine meßbare Drehung der 2. Jaminplatte (Abb. 5). Auf diese Weise wird allerdings nur der Brechungsindex und nicht sein

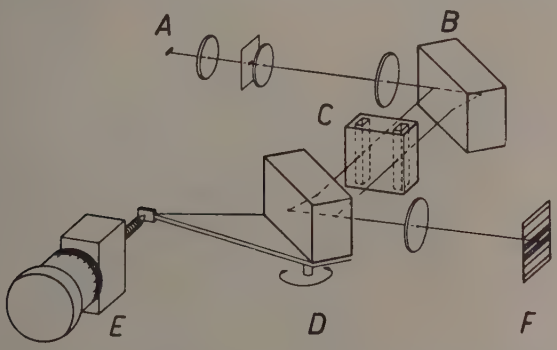


Abb. 5. *A*. Lichtquelle (belichteter Spalt). *B*. Jaminplatte. *C*. Küvette mit Meß- und Vergleichskanal. *D*. Kompensationsjaminplatte. *E*. Meßschraube. *F*. Beugungsfiguren

Differentialquotient gemessen. Die Differenzierung erfolgt punktweise durch eine sehr sinnreiche mechanische Vorrichtung. Die Empfindlichkeit ist bei diesem Verfahren sehr groß, da man statt der Helligkeitsempfindung des Auges bzw. der photographischen Platte die Farbempfindlichkeit des Auges heranzieht. Man kann noch Konzentrationsunterschiede einer Proteinlösung von 0,001% erkennen[9, 21].

Das besprochene Verfahren gestattet von allen elektrophoretischen Methoden die schnellste Durchführung einer Analyse. Mit der Dialyse des Untersuchungsmaterials, die der elektrophoretischen Bestimmung vorhergehen muß, dauert eine quantitative Bestimmung insgesamt etwa 2 Stunden.

Es seien nun kurz einige Anwendungen der freien Elektrophorese und die Grenzen dieser Methode besprochen. Die Elektrophorese wird noch immer am meisten in der Medizin, und zwar zur Untersuchung von Serum verwendet. Man kann mit ihrer Hilfe sehr feine Unterschiede in der Zusammensetzung der makromolekularen Substanzen erkennen und wertvolle diagnostische Hinweise gewinnen. Auf nähere Einzelheiten soll hier nicht eingegangen werden, über dieses Gebiet existieren zwei sehr ausführliche Bücher mit mehr als 1000 Literaturhinweisen[21, 22]. Auch die makromolekularen Substanzen vieler anderer Körperflüssigkeiten z. B.

des Augenwassers, der Erythrocytenproteine, des Harns, der Kniegelenksergüsse, Muskelproteine, des Pleuraexudates und der Samenflüssigkeit wurden untersucht[21–24]. Grundsätzlich eignet sich die freie Elektrophorese zur Untersuchung aller löslichen Proteine und man hat von dieser Tatsache auch weitgehend Gebrauch gemacht. Es dürfte wenig derartige Stoffe geben, die man noch nicht elektrophoretisch untersucht hat. Auf nichtmedizinischem Gebiet hat aber die freie Elektrophorese lange nicht die Verbreitung gefunden wie zur Untersuchung von Serumproteinen. Trotzdem können auch hier wegen der Fülle des Materials nur einige wenige Beispiele genannt werden[25]. In der Nahrungsmittelchemie fand die freie Elektrophorese z. B. zur Untersuchung des Hühnereiweißes[26], der Milchproteine[27] und der Getreideproteine[28] Verwendung. Schlangengifte wurden elektrophoretisch untersucht[29]. In der Enzymologie führte man Messungen an verschiedenen Enzymen und Fermenten[30] durch und in der Bakteriologie benützte man sie zur Untersuchung von Bakterien und Viren[31]. Man arbeitete auch mit Nichteiweißstoffen, sofern sie in Wasser löslich oder suspendierbar sind, elektrische Ladungen tragen oder durch Adsorption bzw. chemische Bindung elektrisch geladener Teilchen solche bekommen. Als Beispiele könnte man hier die Untersuchung von Polysacchariden[32], von Nukleinsäuren[33] und von Suspensionen anorganischer Stoffe[34] nennen. Die Anwendung der freien Elektrophorese mit wandernden Fronten scheint auch in Zukunft überall dort berechtigt und entwicklungsfähig zu sein, wo Substanzen untersucht werden sollen, die man nicht der Zonenelektrophorese unterwerfen kann, sei es, daß sie zu stark adsorbiert werden, sei es, daß die Teilchen zu groß sind. Allen anderen elektrophoretischen Verfahren ist die freie Elektrophorese außerdem dadurch überlegen, daß mit Hilfe der optischen Methoden die qualitative und quantitative Auftrennung während der gesamten Versuchsdauer verfolgt werden kann. Auch die Geschwindigkeit, mit der die Versuchsresultate vorliegen, und die Reproduzierbarkeit (der mittlere Fehler einer Albuminbestimmung im Humanserum liegt zwischen 0,3 und 0,5% des Gesamtproteingehaltes[21, 22]) werden von anderen Methoden kaum erreicht.

Bei so vielen Vorteilen hat die freie Elektrophorese natürlich auch einige Nachteile, sonst hätte wahrscheinlich auch niemand andere Methoden ausgearbeitet. Ein sehr wesentlicher Nachteil ist z. B., daß die erforderliche Einrichtung sehr kompliziert und kostspielig ist. Es liegen zwar einige Versuche vor, die Apparatur zu vereinfachen[35], doch geht das auf Kosten der Genauigkeit und der Empfindlichkeit. Die Grenzen ihrer Anwendung liegen ferner in der Auswahl der Stoffgebiete: man kann nur hochmolekulare Stoffe untersuchen. Die Wanderungsstrecken sind nur sehr klein, damit die Grenzflächen nicht durch elektroosmotische Vorgänge zerstört werden. Quantitative Auswertungen sind z. B. nur

für Wanderungsstrecken bis zu 40 mm möglich. Für qualitative Untersuchungen und bei Maßnahmen zur Unterdrückung der Elektroosmose[9] kann man diese Wanderungsstrecke verdoppeln bis verdreifachen, doch sind dann meist schon apparative Grenzen gesetzt. Eine Reindarstellung der einzelnen Komponenten ist praktisch nicht möglich, da ja, wie beschrieben, nur eine partielle Entmischung eintritt. Bestenfalls kann man, wie leicht einzusehen ist, jeweils einen Teil der schnellsten und der langsamsten Komponente rein gewinnen. Ein weiterer sehr unangenehmer Nachteil ist, wie erwähnt, der relativ hohe Substanzverbrauch.

Einige dieser Nachteile werden bei der zweiten, derzeit verbreitetsten Form der Elektrophorese, der Zonenelektrophorese vermieden. Bei dieser erfolgt die elektrophoretische Wanderung in einem Streifen eines porösen Materials, meist Filtrierpapier, das mit Puffer getränkt ist. Das Untersuchungsmaterial wird in Form eines Striches normal zum Spannungsgefälle aufgetragen. Legt man nun an den Streifen eine elektrische Spannung an, so beginnen die Stoffe zu wandern. Es findet hiebei, im Gegensatz zur freien Elektrophorese, eine vollständige Trennung der zu untersuchenden Substanzen statt. (Abb. 1.)

Zonenelektrophoretische Methoden hat man schon verhältnismäßig früh zur Auftrennung von Substanzgemischen verwendet. So versuchten *Field* und *Teague*[36] 1907 Diphtherietoxin und -antitoxin in einem Agargel zu trennen. Auch die Auftrennung von anorganischen Ionen wurde auf ähnliche Weise versucht. So arbeiteten *Kendall* und Mitarbeiter[37, 38] mit Gemischen von seltenen Erden, Zirkon und Hafnium sowie Radium und Mesothorium, wobei sie Trennwege bis zu 3 m Länge benutzten. Später gelang anderen Autoren[39] sogar die Entmischung von Kalium-Isotopen. In der Mitte der 20er Jahre wurde von *Fürth* und *Gicklhorn*[40] eine Methode zur Bestimmung der elektrischen Ladungen von gelösten Stoffen beschrieben, die man als Vorläufer der Hochvoltelektrophorese bezeichnen kann. Auch die Verwendung von Filtrierpapier zur Stabilisierung des Puffers wurde von diesen Autoren bereits vorgeschlagen. Als eigentliche Entdecker der Papierelektrophorese aber kann man wohl *Paul König* in Brasilien, der 1938 die Methode zur Auftrennung von Schlangengift verwendete[41], und *Th. Wieland*, dessen Arbeit 1948 erschienen ist[42], bezeichnen. In der Folgezeit hat dann die Papierelektrophorese eine ähnliche stürmische Entwicklung durchgemacht wie die Papierchromatographie. 1950 waren etwa 10 Arbeiten auf diesem Gebiet bekannt, Mitte 1953 waren es bereits über 500 und Anfang 1954 über 1000. Diese rasche Verbreitung ist wenig verwunderlich, die Methode ist leicht durchzuführen, sie erfordert nur einen geringen apparativen Aufwand und gibt gute Auftrennungen.

Man kann nun die Papierelektrophorese grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten durchführen: mit niedrigen und mit hohen Spannungs-

gefällen. Die klassische Form ist die für niedrige Spannungsgefälle. Im Prinzip handelt es sich um eine feuchte Kammer, in der sich ein waagrechter Papierstreifen befindet (Abb. 6). Dessen beide Enden tauchen in Puffergefäße, an die die Spannung gelegt wird. Das Untersuchungsmaterial wird in Form eines Striches normal zur Längsrichtung aufgetragen und dann unter dem Einfluß des elektrischen Stromes getrennt. Bei dieser Anordnung soll das Spannungsgefälle 3 bis 5 V/cm nicht übersteigen. Derartige Apparaturen sind weit verbreitet, in der Ausführung von *Grassmann* und *Hannig*[43] sind ca. 2000 Einrichtungen in Verwendung. Zur Untersuchung von hochmolekularen Stoffen stellen sie noch immer die einfachste Möglichkeit dar, man bekommt sehr gute Auftrennungen. Auf Einzelheiten soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden, es sei auf die einschlägige Literatur[44] verwiesen. Die Methode wurde auch zur Untersuchung von verschiedenen niedrigmolekularen Stoffklassen verwendet, z. B. Alkaloiden[45], Aminosäuren[46], biogenen Aminen[47], Flavonen[48], Kohlenhydraten[49], Phosphatiden[50], Purinen[51], Sulfonamiden[52] und den Vitaminen der B-Gruppe[53]. Auch Gemische anorganischer Ionen ließen sich auftrennen, so etwa die seltenen Erden[54], die Sulfobasen[55] und Polyphosphate[56].

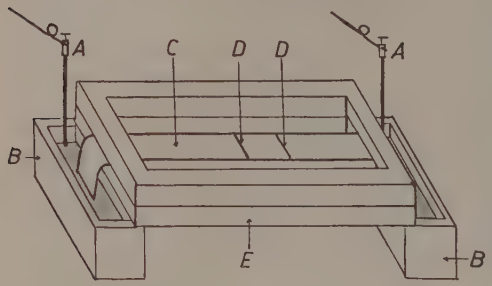


Abb. 6. *A.* Elektroden. *B.* Puffergefäße. *C.* Filtrierpapierstreifen. *D.* Substanz. *E.* Feuchte Kammer

Die Ableitung der Jouleschen Wärme erfolgt bei den frei hängenden Streifen in Form von Verdunstungswärme[57, 58]. Das führt, wie leicht einzusehen ist, allmählich zu einer Austrocknung des Streifens, frischer Puffer strömt von den Elektrodengefäßen zur Mitte des Filtrierpapierstreifens, es bildet sich eine stetige Pufferströmung aus. Diese Pufferströmung ist naturgemäß in den Randgebieten des Streifens am stärksten, gegen die Mitte zu sinkt sie linear gegen 0 ab. Eine quantitative Messung dieser Erscheinung zeigt die Abb. 7. Die Abszisse gibt die cm Filtrierpapierstreifen an, die Ordinate das Spannungsgefälle in V/cm bzw. die Strömungsgeschwindigkeit des Puffers in mm/10 min. Wenn etwa die Substanz zwischen dem 2. und 4. cm (Abszisse) aufgetragen wird, so wird sie zunächst durch elektrische und mechanische Kräfte in der gleichen Richtung bewegt. Geht man zur Mitte zu, so werden die mechanischen Kräfte immer schwächer, sie sinken schließlich auf 0 ab. Die Bewegung der Teilchen erfolgt nur mehr durch die elektrischen Kräfte.

Beim weiteren Wandern wirken einander mechanische und elektrische Kräfte entgegen, bis beide gleich groß sind, das heißt, bis sich schließlich ein Gleichgewichtszustand einstellt. Eine Verlängerung der Versuchsdauer über diesen Zeitpunkt hinaus bringt keine Verbesserung der Auftrennung mehr. Es herrschen hier also ähnliche Verhältnisse wie bei der Elektrorheophorese[59].

Bei der Anordnung mit frei hängenden Streifen hat man also, genau wie bei der freien Elektrophorese, eine maximale Wanderungsstrecke, die

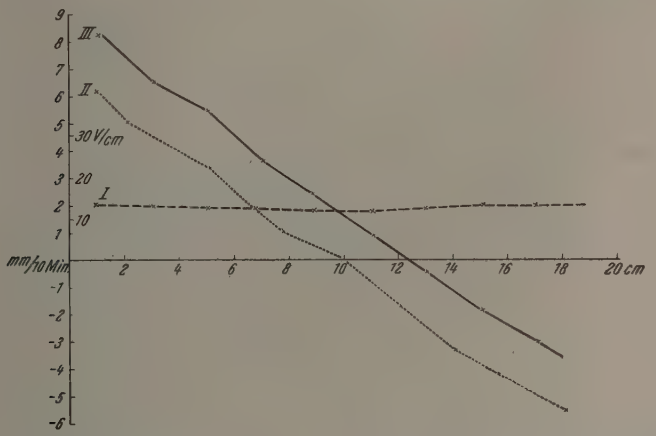


Abb. 7. *I.* Spannungsgefälle in Volt pro cm. *II.* Strömungsgeschwindigkeit des Puffers in mm pro 10 Minuten. *III.* Resultierende Geschwindigkeit eines Teilchens mit der Beweglichkeit von $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ cm $\cdot$ V^{-1} $\cdot$ sek^{-1}

weitgehend durch die Pufferkonzentration und das Spannungsgefälle bestimmt ist. Sie liegt bei den üblichen Versuchsanordnungen bei 10 bis 20 cm. Je stärker man das Spannungsgefälle erhöht, desto kleiner wird die optimale Wanderungsstrecke. Das ist dadurch bedingt, daß bei der Erhöhung des Spannungsgefälles die Wanderungsgeschwindigkeit linear, die entwickelte Joulesche Wärme jedoch quadratisch wächst und dementsprechend mehr Lösungsmittel verdunstet. Um die Untersuchungsdauer, die für Serumanalysen bei einem Spannungsgefälle von 3 bis 5 V/cm etwa 12 Stunden beträgt, herabzusetzen, war man bestrebt, das Spannungsgefälle zu erhöhen. Einige Autoren versuchten das ohne wesentliche Änderungen der Apparate[60]. Die Auftrennungen waren aber meist weniger gut, als bei niedrigen Spannungsgefällen. Eine Lösung dieses Problems gelingt durch Anwendung geeigneter Kühlvorrichtungen oder durch die Berücksichtigung der oben beschriebenen Pufferströmung, die z. B. bei der Verwendung von trapezförmigen Streifen erreicht wird[58].

Diese Methode bringt folgende Vorteile: es wirken im ganzen Versuchsbereich elektrische und mechanische Kräfte in der gleichen Richtung; dadurch wird wirklich möglichst viel von der zugeführten elektrischen Energie zur Auftrennung der Teilchen verwendet. Ferner steigt das Spannungsgefälle gegen das schmälere Ende des Streifens zu an, die schnellsten Teilchen kommen in ein stärkeres elektrisches Feld und wandern dadurch noch schneller. Man bekommt also bei einem gleichen mittleren Spannungsgefälle eine bessere Auftrennung als bei rechteckigen Streifen. Weitere Vorteile sind, daß man an den breit ren Stellen des Streifens verhältnismäßig viel Substanz auftragen kann. Ist diese dann an die schmäleren Stellen gewandert, so ist die Auftrennung schon so weit fortgeschritten, daß keine Störungen durch zu hohe Konzentrationen mehr zu befürchten sind. Auch bei dieser Methode gibt es eine optimale Wanderungsstrecke.

Keine Beschränkung des Wanderungsweges hat man bei den Methoden, bei denen die Joulesche Wärme durch Wärmeleitung abgeführt wird. Der Filtrierpapierstreifen befindet sich bei diesem Verfahren zwischen gekühlten Platten oder unter einer mit dem Puffer nicht mischbaren Flüssigkeit[61]. Derartige Versuchseinrichtungen eignen sich weniger zur Auftrennung von Proteingemischen. Sie sind jedoch, da man bei entsprechend wirksamer Kühlung Spannungsgefälle bis etwa 200 V/cm anlegen kann, eine ausgezeichnete Methode zur Untersuchung von niedrigmolekularen Substanzen[61–72]. Bei derartigen Trennungen, sei es Papierchromatographie oder Papierelektrophorese, wirkt die Vergrößerung der Substanzflecken durch Diffusion einer Auftrennung entgegen. Befinden sich etwa auf einem Fleck von 0,5 cm Durchmesser zwei Stoffe und vergrößert sich der Fleck während der Versuchsdauer von 0,5 cm auf 1 cm, so muß man beide Substanzen mindestens 1 cm auseinanderziehen, um eine Trennung erkennen zu können. Gelingt es aber, etwa durch Verwendung starker Spannungsgefälle, die Versuchsdauer so kurz zu halten, daß praktisch keine Vergrößerung der Flecken stattfindet, so genügt die halbe Wanderungsstrecke. Man hat dabei einen doppelten Gewinn, einmal durch die schnelle Wanderung zufolge des starken Spannungsgefälles und andererseits durch die geringere notwendige Wanderungsstrecke. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist ferner, daß die einzige Beschränkung der Wanderungsstrecke durch die Größe der Apparatur gegeben ist. Derzeit verwendet man Wanderungsstrecken bis zu etwa 1 m[64]. Das Auftrennungsvermögen dieser Methode ist also sehr beträchtlich, es übertrifft das der Papierchromatographie bei bestimmten Substanzklassen, etwa Peptiden, wesentlich. Als Beispiele seien die Arbeiten von *Kickhöfen* und *Westphal*[64] über Aminosäuren und Peptide erwähnt, die Arbeiten von *Gross*[65], der Kohlenhydratgemische untersuchte, und die Versuche von *Turba*[66], der sich mit Nukleinsäureabbauprodukten

beschäftigte. Ferner sind die Untersuchungen von *Heilmeyer* und Mitarbeitern bekannt geworden[67], die sich mit den für den Reststickstoff verantwortlichen Substanzen befassen. Unsere Versuche behandelten die Trennung von Zuckern, mehrwertigen Alkoholen, Phenolen[63], Nicht-α-Aminosäuren[68], Hormonen[70] und Purinen, vor allem methylierten Xanthinen[71]. Es ist auch gelungen, durch Verwendung von weitgehend wasserfreien Lösungsmitteln Substanzen der Papier lektrophorese zu unterwerfen, die sonst nur in organischen Lösungsmitteln löslich sind, etwa aromatische Amine, Farbstoffe u. ä.[72]. Für präparative Trennungen hat sich vor allem die Elektrophorese in Stärkesäulen[73] oder Platten[58, 74] bewährt.

Die qualitative und quantitative Auswertung von Elektrophoresediagrammen auf Filtrierpapier kann normalerweise erst nach Beendigung des Versuches durch Trocknen und Sichtbarmachen der Substanz mit Hilfe von Farbreaktionen erfolgen. Verfügt man über Farbreaktionen, bei denen der Farbstoffgehalt der Konzentration der zu untersuchenden Substanz proportional ist, wird auch eine quantitative Auswertung möglich. Hiezu ist eine ganze Anzahl von Verfahren entwickelt worden[21, 22, 44], auf die ich kurz eingehen möchte. Man kann grundsätzlich zwischen verteilungs*unabhängigen* — bei diesen findet eine richtige Integration auch bei Konzentrationsunterschieden *normal* zur Wanderungsrichtung statt — und verteilungs*abhängigen* Verfahren unterscheiden. Die verteilungs*unabhängigen* Verfahren gestatten auch die exakte Auswertung von verzerrten Diagrammen, also von solchen, bei denen die Streifen nicht streng parallel verlaufen. Zu diesen gehört das Verfahren von *Turba* und *Enenkel*[75] sowie von *Cremer* und *Tiselius*[61]. Man zerschneidet hiebei das Filtrierpapier in eine Anzahl kleine Streifchen, eluiert den Farbstoff und bestimmt ihn kolorimetrisch. Auch die Verfahren, die mit radioaktiven Stoffen arbeiten[76], sind verteilungsunabhängig.

Bei den verteilungsabhängigen Verfahren werden an die Auftrennung wesentlich höhere Anforderungen gestellt. Die Substanzstreifen dürfen keinen Konzentrationsgradienten normal zur Streifenrichtung aufweisen. Am häufigsten bestimmt man die Konzentrationen mittels Spaltkolorimetern[43]. Bei diesen bewegt man den mit Hilfe von Bromnaphthalin oder ähnlichen Lösungsmitteln durchsichtig gemachten Streifen an einem beleuchteten Spalt, der normal zur Längsrichtung des Streifens verläuft, vorbei und bestimmt mit Hilfe einer Photozelle die Extinktion. Derartige Apparaturen können mit entsprechendem Aufwand auch zu vollautomatischen Einrichtungen ausgebaut werden. Mit wesentlich weniger Aufwand kommt man mit Hilfe einer photographischen Einrichtung zu selbstregistrierten Kurven, etwa durch die Zylinderlinsen-Graukeil-Methode[77]. Bei dieser befindet sich auf der Bühne eines photographischen Vergrößerungsapparates der durchsichtig gemachte Streifen

bzw. sein Negativ. Mit Hilfe einer Zylinderlinse, deren Brechungsgefälle in der Richtung des Filtrierpapierstreifens liegt, wird dieser auf einem photographischen Papier unter Zwischenschaltung eines Graukeiles abgebildet. Man erhält Schattenkurven, die durch Umwandlung der verschieden starken Lichtstreifen in größere oder kleinere Hügel entstanden sind. Die jeweilige Höhe dieser Hügel ist ein Maß für die Extinktionsdifferenz zwischen den angefärbten und den nicht angefärbten Stellen des Papierstreifens.

Die Zylinderlinse und den Graukeil kann man auch durch geeignete mechanische Maßnahmen ersetzen. Den gleichen Effekt, den die Zylinderlinse bewirkt, erreicht man dadurch, daß man das photographische Papier während der Belichtung normal zur Längsrichtung des Filtrierpapierstreifens bewegt. Der Graukeil wird durch Beschleunigung oder Verzögerung dieser Bewegung ersetzt. Bei der Verwendung eines geeigneten Schlittens kann man einen photographischen Vergrößerungsapparat mit einer normalen Optik verwenden, wodurch man an Lichtstärke und Schärfe des Bildes wesentlich gewinnt.

Die hier besprochenen verteilungs*abhängigen* Verfahren werden weitgehend verteilungs*unabhängig*, wenn man zur quantitativen Auswertung nicht die gesamte Filtrierpapierbreite verwendet, sondern nur ein wenige mm breites Stück.

Zu den verteilungsabhängigen Verfahren muß man auch die Retentionsanalyse von *Th. Wieland*[78] rechnen.

Zusammenfassend läßt sich über die Papier- bzw. Zonenelektrophorese sagen, daß sie folgende Vorteile bietet: einfache Apparaturen, vollkommene Trennung der Substanzen, keine Beschränkung der Wanderungsstrecke bei geeigneter Kühlung, geringer Materialverbrauch und die Möglichkeit, auch niedrigmolekulare Stoffe untersuchen zu können. Nachteile sind, daß eine quantitative Auswertung erst nach der Beendigung des Versuches möglich ist, daß der mittlere Fehler einer Bestimmung etwa doppelt bis fünfmal so groß ist wie bei der freien Elektrophorese (er beträgt z. B. bei einer Albuminbestimmung im Serum 1,0 bis 2,5% vom Gesamteiweiß[21, 22, 44, 79]) und daß schließlich das Stabilisierungsmittel, also meist das Filtrierpapier, mit der untersuchten Substanz in Wechselwirkung treten kann.

Wie in diesem Vortrag ausgeführt wurde, gestatten die elektrophoretischen Methoden die qualitative und quantitative Analyse von Stoffen, deren Teilchengröße vom niedrigmolekularen anorganischen Ion bis zu mikroskopisch sichtbaren Partikeln reichen kann. Die einzige Voraussetzung dafür ist, daß die Teilchen eine elektrische Ladung besitzen oder durch das Milieu bekommen. Die für eine Untersuchung benötigten Substanzmengen gehen hinunter bis zu 0,01 μg[76]. Andererseits kann man noch Gramm-Mengen präparativ trennen[73].

Der Autor dankt Herrn Prof. Dr. *H. J. Antweiler*, Bonn, für die Unterlagen zu den Abb. 2 und 5 und Herrn Dr. *H. Svensson*, Stockholm, für die Abb. 3 und 4.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beabsichtigt, eine Übersicht über die Methodik und die Anwendung der freien und der Zonenelektrophorese zu geben. Bei der freien Elektrophorese wird als Nachweismethode für die wandernden Fronten ein Verfahren von *Svensson* geschildert, das gleichzeitig eine Integral- und eine Differentialkurve des Brechungsquotienten in Abhängigkeit von der Küvettenhöhe liefert. Als Beispiel für die freie Mikroelektrophorese wird die Apparatur nach *Antweiler* genauer besprochen. Daran schließt sich ein Überblick über die Anwendungsmethoden der freien Elektrophorese und eine Diskussion der Vor- und Nachteile dieser Methode. Bei der Zonenelektrophorese wird hauptsächlich auf die Papierelektrophorese eingegangen, wobei die Trennmöglichkeiten bei niedrigen und hohen Spannungsgefällen diskutiert werden. Als Beispiel werden hauptsächlich Trennungen von niedrigmolekularen Ionen angeführt. Schließlich werden Geräte zur quantitativen Auswertung von Elektropherogrammen auf Filtrierpapier besprochen.

Summary

The objective of the present study is to survey the methodology and the application of free and zone electrophoresis. For free electrophoresis, a description is given of a detection method for the migrating front worked out by *Svensson*, which yields simultaneously an integral and differential curve of the refractive quotients in relation to the height of the cell. The apparatus of *Antweiler* is discussed in some detail as an example of micro electrophoresis. To this is added a survey of the application methods of free electrophoresis and a discussion of the advantages and disadvantages of this method. With respect to zone electrophoresis stress is laid principally on paper electrophoresis and the possibilities of separation at low and high potential falls are discussed. Separations of low molecular ions are cited primarily as examples. In conclusion, devices for the quantitative employment of electropherograms on filter paper are described.

Résumé

L'objet du présent travail est de donner un aperçu sur les méthodes et l'emploi de l'électrophorèse libre et de zone. Pour l'électrophorèse libre on esquisse la technique de *Svensson* qui permet d'identifier les fronts en migration; elle fournit simultanément une courbe intégrale et une courbe différentielle de l'indice de réfraction qui dépendent de la hauteur de la cuve. L'appareil de *Antweiler* est décrit avec plus de détails comme exemple de la microélectrophorèse libre. On y joint un aperçu sur les méthodes d'application de l'électrophorèse libre ainsi qu'une discussion sur leurs avantages et leurs inconvénients. En ce qui concerne l'électrophorèse de zone on insiste principalement sur l'électrophorèse sur papier au sujet de laquelle on présente une discussion relative aux possibilités de séparations sous chutes de tension

faibles ou élevées. A titre d'exemple, on cite principalement les séparations d'ions de faibles molarité. On montre finalement des appareils permettant l'exploitation quantitative d'électrophérogrammes sur papier filtre.

Literatur

[1] *A. J. P. Martin* und *R. L. M. Synge*, Advances of Protein Chemistry **2**, 31 (1945).

[2] *G. Wiedemann*, Poggendorfs Ann. **87**, 321 (1852).

[3] *G. Quinke*, Poggendorfs Ann. **113**, 513 (1861).

[4] *F. F. Reuss*, Mém. soc. natural Moscou **2**, 327 (1808), zit. nach 2. und 3.

[5] Vgl. *J. A. V. Butler*, Electrical Phenomena at Interfaces. London: 1951.

[6] *A. Tiselius*, Trans. Faraday Soc. **33**, 524 (1937); Kolloid-Z. **85**, 129 (1938).

[7] *L. Ebert*, Wien-Harms Handbuch der Exp.-Physik **12/1**, 293 (1932).

[8] *A. J. Rutgers*, *L. Facq* und *J. L. van der Minne*, Nature **166**, 100 (1950).

[9] *H. J. Antweiler*, Kolloid-Z. **115**, 130 (1949); Mikrochem. **36/37**, 561 (1951); *H. J. Antweiler* in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl), 4. Aufl., 3. Bd./2, in Druck.

[10] *H. Theorell* in *E. Abderhalden*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. V, 1097 (1936).

[11] *H. Svensson*, Ark. Kemi Mineral. Geol. (A) **22**, Nr. 10 (1946).

[12] *A. Tiselius* in *E. Abderhalden*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. III/B, 629 (1929).

[13] Ausnahme: Halbmikroapp. nach *D. H. Moore* und *J. U. White*, Rev. Sci. Instruments **19**, 700 (1948).

[14] *L. G. Longsworth*, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 529 (1939); Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **18**, 219 (1946).

[15] *O. Lamm*, Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis (IV) **10**, Nr. 6 (1937).

[16] *H. Svensson*, Kolloid-Z. **87**, 181 (1939); **90**, 141 (1940).

[17] *H. Labhard* und *H. Staub*, Helv. Chim. Acta **30**, 1954 (1947). *W. Lotmar*, Helv. Chim. Acta **32**, 1847 (1949). *H. Svensson*, Acta Chem. Scand. **3**, 1170 (1949). *L. G. Longsworth*, Analyt. Chemistry **23**, 347 (1951). *E. Wiedemann*, Helv. Chim. Acta **35**, 82 (1952).

[18] *H. Svensson*, Acta Chem. Scand. **4**, 399, 1329 (1950); **5**, 1301 (1951); **7**, 159 (1953).

[19] *H. Svensson* und *R. Forsberg*, J. Opt. Soc. Amer. **44**, 414 (1954).

[20] *M. J. Jamin*, Ann. chim. phys. **52** [3], 166 (1858).

[21] *H. J. Antweiler*, Die quantitative Elektrophorese in der Medizin. Berlin: 1952.

[22] *F. Wuhrmann* und *Ch. Wunderly*, Die Bluteiweißkörper des Menschen. Basel: Schwabe. 1952.

[23] *G. Hamoir*, Discuss. Faraday Soc. **13**, 116 (1953).

[24] *T. Erdos*, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. **3**, 525 (1953), zit. nach Chem. Abstr. **47**, 6999 (1953).

[25] Vgl. *E. Wiedemann*, Chimia **2**, 25 (1948).

[26] *R. H. Forsythe* und *J. F. Foster*, J. Biol. Chem. **184**, 377 (1950). *R. C. Warner* in *H. Neurath* und *K. Bailey*, The Proteins **2/1**, 435, New York: 1954.

[27] *Th. L. McMeekin*, Advances of Protein Chemistry **5**, 201 (1949) und in *H. Neurath* und *K. Bailey*, The Proteins, **2/1**, 389, New York: 1954.

[28] *J. F. Foster*, *J. T. Yang* und *N. H. Yui*, Cereal Chem. **27**, 477 (1950). *S. Brohult* und *E. Sandegren* in *H. Neurath* und *K. Bailey*, The Proteins **2/1**, 487 (1954).

[29] *A. Polson, F. J. Joubert* und *D. A. Haig*, Biochemic. J. **40**, 265 (1946). *J. M. Goncalves* und *A. Polson*, Arch. Biochemistry **13**, 253 (1947). *J. M. Goncalves* und *L. G. Vieira*, An. Acad. Brasil. Cienc. **22**, 141 (1950). *F. G. Fischer* und *W. P. Neumann*, Z. physiol. Chem. **297**, 92 (1954).

[30] Vgl. *J. B. Sumner* und *G. F. Somers*, Chemistry and Methods of Enzymes. New York: 1953. S. 58. *O. Hoffmann-Ostenhof*, Enzymologie. Wien: Springer-Verlag. 1954. S. 27.

[31] *P. J. Barry* und *A. M. James*, J. Chem. Soc. London **1952**, 3340. *C. C. Brinton*, Jr., *A. Buzzell* und *M. A. Lauffer*, Biochim. Biophys. Acta **15**, 533 (1954). *F. W. Putnam*, Science **111**, 481 (1950). *G. Schramm*, Biochemie der Viren. Berlin: 1954.

[32] *R. A. Alberty* und *M. Heidelberger*, J. Amer. Chem. Soc. **70**, 211 (1948). *E. Norberg* und *D. French*, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 1202 (1950). *L. Delcombe*, Bull. soc. chim. Belgique **59**, 508 (1950).

[33] *N. Ui* und *I. Watanabe*, Bull. Chem. Soc. Japan **24**, 4, 210 (1951).

[34] *K. N. Davies* und *A. K. Holliday*, Trans. Faraday Soc. **48**, 1061 (1952).

[35] *A. Polson, F. J. Joubert* und *D. A. Haig*, Biochemic. J. **40**, 265 (1946). *M. Macheboeuf* C. r. soc. biol. Paris **135**, 1241 (1941). *M. Dubuisson, A. Distèche* und *A. Debot*, Biochim. Biophys. Acta **6**, 97 (1950). *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 23 (1951).

[36] *G. Field* und *S. Teague*, J. Exper. Med. **9**, 86, 225 (1907).

[37] *J. Kendall, E. Jette* und *W. West*, J. Amer. Chem. Soc. **48**, 2619, 3114 (1926).

[38] *J. Kendall*, Science **67**, 163 (1928).

[39] *A. K. Brewer* und *S. L. Madorsky*, Science **104**, 156 (1946).

[40] Ref. in *R. Keller* und *J. Gicklhorn* in *E. Abderhalden*, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. V/2, 1206 (1928).

[41] *P. König*, Actas III Congr. Sud Americ. Chimica **2**, 334 (1937). *D. von Klobusitzky* und *P. König*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **192**, 271 (1939).

[42] *Th. Wieland*, Angew. Chem. A **60**, 313 (1948). *Th. Wieland* und *F. Fischer*, Naturwiss. **35**, 29 (1948).

[43] *W. Grassmann* und *K. Hannig*, Naturwiss. **37**, 496 (1950).

[44] *F. Turba*, Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie. Berlin: 1954. *Ch. Wunderly*, Die Papierelektrophorese. Aarau: 1954. *A. Tiselius* und *P. Flodin*, Advances of Protein Chemistry **8**, 461 (1953). *H. J. McDonald, R. J. Lappe, E. P. Marbach, R. H. Spitzer* und *M. C. Urbin*, The Clinical Chemist **5**, 17 (1953).

[45] *W. Deckers* und *J. Schreiber*, Naturwiss. **40**, 553 (1953).

[46] *E. L. Durrum*, J. Coll. Sci. **6**, 274 (1951).

[47] *R. Weber*, Helv. Chim. Acta **34**, 2031 (1951).

[48] *Y. Hashimoto, I. Mori* und *M. Kimura*, Nature **170**, 975 (1952).

[49] *L. Jaenicke* und *I. Vollbrechtshausen*, Naturwiss. **39**, 86 (1952).

[50] *W. Kanngießer*, Biochem. Z. **325**, 12 (1953).

[51] *W. C. Werkheiser* und *R. J. Winzler*, J. Biol. Chem. **204**, 971 (1953).

[52] *H. Kutzim*, Naturwiss. **39**, 135 (1952).

[53] *N. Siliprandi, D. Siliprandi* und *H. Lis*, Biochim. Biophys. Acta **14**, 216 (1954).

[54] *T. R. Sato, H. Diamond, W. P. Norris* und *H. H. Strain*, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 6154 (1952). *M. Lederer*, C. r. acad. sci., Paris **236**, 200 (1953).

[55] *M. Lederer*, Analyt. Chim. Acta **6**, 355 (1952).

[56] *B. Sansoni* und *R. Klement*, Angew. Chem. **65**, 422 (1953).

[57] *J. de Wael*, Chem. Weekbl. **49**, 229 (1953). *Z. Pucar*, Arkiv za Kemiju **25**, 205 (1953); **26**, 29, 41 (1954).

[58] *H. Michl*, Mh. Chem. **85**, 1251 (1954).

[59] *M. Macheboeuf*, *P. Rebeyrotte*, *J. Dubert* und *M. Brunerie*, Bull. soc. chim. biol. **35**, 334 (1953).

[60] *C. v. Holt*, *K. D. Voigt* und *K. Gaede*, Biochem. Z. **323**, 345 (1952). *W. Mach* und *R. Geffert*, Arzneimittelforsch. **3**, 534 (1953). *A. Dettker* und *H. Anduren*, Scand. J. Clin. Lab. Investigation **6**, 74 (1954).

[61] *D. Cremer* und *A. Tiselius*, Biochem. Z. **320**, 273 (1950).

[62] *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 489 (1951).

[63] *H. Michl*, Mh. Chem. **83**, 737 (1952).

[64] *B. Kickhöfen* und *O. Westphal*, Z. Naturforsch. **7b**, 655, 659 (1952).

[65] *D. Gross*, Nature **172**, 908 (1953); **173**, 487 (1954).

[66] *F. Turba*, *H. Pelzer* und *H. Schuster*, Z. physiol. Chem. **296**, 97 (1954).

[67] *L. Heilmeyer*, *R. Clotten*, *I. Sano*, *A. Sturm*, Jr. und *A. Lipp*, Klin. Wschr. **32**, 831 (1954). Gemische organischer Säuren untersuchten *H. Berbalk* und *O. Schier*. Mh. Chem. **86**, 146 (1955).

[68] *H. Michl* und *H. Kuhn*, Fachl. Mitt. d. Österr. Tabakregie **1954**, 10.

[69] *L. Bilek*, *J. Derkosch*, *H. Michl* und *F. Wessely*, Mh. Chem. **84**, 717 (1953).

[70] *H. Tuppy* und *H. Michl*, Mh. Chem. **84**, 1011 (1953).

[71] *H. Michl* und *F. Haberler*, Mh. Chem. **85**, 779 (1954).

[72] *M. H. Paul* und *E. L. Durrum*, J. Amer. Chem. Soc. **74**, 4721 (1952).

[73] *P. Flodin* und *J. Porath*, Biochim. Biophys. Acta **13**, 175 (1954).

[74] *H. Michl*, Mh. Chem. **85**, 1240 (1954).

[75] *F. Turba* und *H. J. Enenkel*, Naturwiss. **37**, 93 (1950).

[76] *H. G. Nöller*, Klin. Wschr. **32**, 988 (1954).

[77] *H. Michl*, Mh. Chem. **83**, 210 (1952) und unveröffentlichte Versuche.

[78] *Th. Wieland* und *L. Wirth*, Angew. Chem. **62**, 473 (1950).

[79] *W. Grassmann* und *K. Hannig*, Klin. Wschr. **32**, 838 (1954).

Aus dem Max-Planck-Institut für Chemie, Mainz

Anwendung der Massenspektroskopie in der analytischen Chemie

Von

H. Hintenberger

Mit 15 Abbildungen

(Eingelangt am 28. April 1955)

Einleitung

Bei einer massenspektroskopischen Untersuchung müssen von der Versuchssubstanz zunächst Ionen erzeugt werden, die dann mit Hilfe einer hohen elektrischen Gleichspannung im Vakuum beschleunigt werden. Der dabei entstehende Ionenstrahl wird durch elektrische und magnetische Ablenkfelder geschossen und beschreibt dort je nach der Masse der Ionen verschiedene Bahnen. Der Strahl wird also nach Ionen verschiedener Masse zerlegt, die dann mit Hilfe einer Photoplatte oder eines empfindlichen elektrischen Gerätes nachgewiesen werden können. Obwohl dieses Untersuchungsverfahren von den Physikern zunächst nur dazu entwickelt worden ist, die Isotopenzusammensetzung der chemischen Elemente zu untersuchen und dabei sowohl die Isotopenhäufigkeiten als auch die genauen Atommassen zu bestimmen, hat es sich doch im Laufe der Zeit zu einem wertvollen Hilfsmittel bei chemischen Analysen entwickelt. Es soll das Ziel dieses Vortrags sein, einen Überblick über die in der Massenspektroskopie verwendeten Apparate und Untersuchungsmethoden zu geben und an Hand von charakteristischen Beispielen zu zeigen, welche analytischen Probleme vorteilhaft auf massenspektroskopischem Wege gelöst werden können.

Ionenerzeugung

Am einfachsten ist es, wenn die Versuchssubstanz im gasförmigen Zustand vorliegt. Sie wird dann aus einem Vorratsgefäß durch einen hohen Strömungswiderstand in die Ionenquelle eingelassen und dort durch Elektronenstoß ionisiert. Eine solche Elektronenstoß-Ionenquelle

ist in Abb. 1 dargestellt. Die Ionenquelle selbst besteht im wesentlichen aus einem fast geschlossenen Blechgehäuse B, das von einem Elektronenstrahl durchlaufen wird. Die Elektronen werden von einer Glühkathode K erzeugt und durch eine Gleichspannung von etwa 100 Volt zum Gehäuse B hin beschleunigt. Durch den Schlitz S_1 wird ein feiner Elektronenstrahl ausgeblendet, der das Gehäuse durchläuft und dabei durch Zusammenstöße mit den Gasatomen positive Ionen bildet. Durch eine Elektrode P, die dem Gehäuse gegenüber schwach positiv aufgeladen ist, werden die Ionen durch die Öffnung S_3 aus dem Stoßraum herausgeführt und dann durch eine elektrische Beschleunigungsspannung von einigen tausend Volt gegen den Eintrittsschlitz S_4 des Massenspektrographen beschleunigt. Hier wird ein feiner Ionenstrahl ausgeblendet, der im Massenspektrographen analysiert werden kann. Die Ionen haben ziemlich genau alle die gleiche kinetische Energie. Das ist für die massenspektroskopische Untersuchung, wie wir noch sehen werden, ein großer Vorteil.

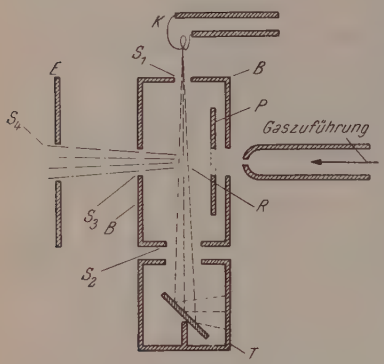


Abb. 1. Elektronenstoß-Ionenquelle

Liegt die zu untersuchende Substanz als fester Körper vor, so kann man anstatt der Gaszuleitung ein Öfchen einbauen, das im Vakuum geheizt wird, und die Versuchssubstanz in den Stoßraum R hineindampfen.

Man kann auch mit Gasentladungsröhren Ionenstrahlen erzeugen, doch hat dieses Verfahren den Nachteil, daß die Ionen in der Regel sehr verschiedene Energien besitzen.

Bei festen Stoffen, insbesondere bei Metallen, kann man die Ionen auch mit Hilfe eines Hochfrequenzfunkens erzeugen. Man macht dazu aus dem zu untersuchenden Material zwei Stifte, zwischen denen durch eine hochfrequente Wechselspannung im Vakuum ein Funken erzeugt wird.

Man kann auch von Salzen und anderen nichtleitenden Substanzen auf diese Weise Ionen erhalten. Die Stoffe werden dann pulverisiert und in ein dünnes Metallröhrchen gefüllt, das als Elektrode für den Funken verwendet wird.

Ein sehr einfaches Verfahren, Ionen zu erzeugen, wird bei den thermischen Ionenquellen ausgenutzt. Dabei wird von der Tatsache Gebrauch gemacht, daß Atome an heißen Metalloberflächen ionisiert werden. Im einfachsten Fall besteht eine solche Ionenquelle aus einem dünnen Wolframbändchen, das durch einen elektrischen Strom direkt geheizt

wird und auf dessen Mitte eine Spur von der Versuchssubstanz aufgetragen wird. Vom erhitzten Bändchen dampfen im Vakuum an der von der Probe bedeckten Stelle Ionen ab, die dann massenspektroskopisch untersucht werden können. Der Vorteil dieser thermischen Ionenquellen ist, daß die Ionen sehr homogene Energie besitzen und daß man mit außerordentlich kleinen Proben schon intensive Ionenstrahlen erhalten kann. Der Nachteil ist, daß sie nur für Stoffe mit kleiner Ionisierungsarbeit hohe Ausbeuten liefern.

Jedes der besprochenen Verfahren zur Ionenerzeugung hat seine besonderen Vor- und Nachteile; eine universelle Methode, die für alle Substanzen mit gleicher Wirksamkeit angewendet werden könnte, gibt es nicht. Man muß einen Massenspektrographen je nach dem Problem, das damit bearbeitet werden soll, mit der dafür geeigneten Ionenquelle versehen und am besten dafür sorgen, daß verschiedene Arten von Ionenquellen ausgewechselt werden können.

Das Ablenksystem

Das zweite Bauelement, das für einen Massenspektrographen benötigt wird, ist das Ablenksystem, in dem der Ionenstrahl nach verschiedenen Massen zerlegt wird. Wenn die Ionen alle gleiche Energie besitzen, kann man am einfachsten dazu ein homogenes magnetisches Sektorfeld verwenden. In ihm erleidet der Ionenstrahl eine Aufspaltung nach verschiedenen Massen (Abb. 2). Außerdem werden die Ionen, wenn

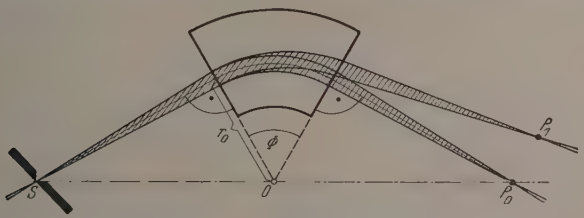


Abb. 2. In einem magnetischen Sektorfeld wird der Ionenstrahl nach verschiedenen Massen aufgespalten. Nach dem Feld werden die in verschiedenen Richtungen durch den Schlitz S kommenden Ionen wieder fokussiert

sie in etwas verschiedenen Richtungen durch den Eintrittsschlitz S eintreten, nach dem Feld wieder zu einem feinen Bündel gesammelt. Auf diese Weise entsteht durch die Ionen der Masse m_0 in Punkt P_0 nach dem Magnetfeld ein Bild des Eintrittsspaltes S. Haben die Ionen eine andere Masse m_1, so liegt das Bild in einem anderen Punkt P_1. Auf einer Photoplatte, die nach dem Feld angebracht wird, erhält man dann ein Massenspektrum. Aus der Lage der Linien kann man auf die Masse der Ionen schließen, die Schwärzung der Photoplatte gibt die

Häufigkeit wieder, mit der die Ionen im Strahl vorhanden waren. Man spricht dann von einem richtungsfokussierenden Massenspektrographen, weil hier Ionen, die durch verschiedene Richtungen durch den Eintrittsspalt kommen, zu einem scharfen Bild fokussiert werden. Vorausgesetzt ist dabei, daß alle Ionen die gleiche Energie besitzen, sonst werden die Linien verwaschen.

Wenn man die Ionen mit Elektronenstoß oder in einer thermischen Ionenquelle erzeugt, dann haben sie genügend homogene Energie, um in einem richtungsfokussierenden Apparat scharfe Bilder zu geben. Benutzt man aber einen Hochfrequenzfunken, dann haben die entstehenden Ionen eine beträchtliche Streuung in ihrer Energie und die Linien werden unscharf. Es sind dann eigene Maßnahmen notwendig, um diese Unschärfe zu beseitigen. Am einfachsten kann man das erreichen, indem man den Ionenstrahl, bevor er ins Magnetfeld kommt, durch ein elektrisches Radialfeld laufen läßt (Abb. 3). Ionen gleicher Energie beschreiben darin gleiche Bahnen, auch wenn sie verschiedene Masse haben. Die Ionen mit kleiner Energie werden aber stärker abgelenkt als solche mit großer Energie. Nach dem elektrischen Feld entsteht daher vom Ionenstrahl ein Energiespektrum in der Bildebene BB' und wenn hier ein Schirm mit einem engen Schlitz S_2 angebracht wird, so können nur Teilchen durch diesen

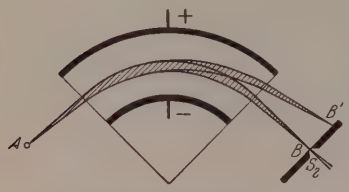


Abb. 3. Elektrisches Radialfeld als Energiefilter

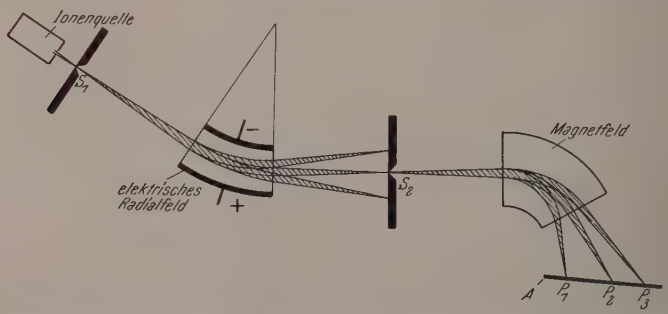


Abb. 4. Ein elektrisches Radialfeld und ein magnetisches Sektorfeld kombiniert ergibt einen Massenspektrographen, der scharfe Linien zeigt, auch wenn Ionen verschiedener Energie aus der Ionenquelle kommen

Schlitz kommen, die alle ziemlich genau die gleiche Energie besitzen. Wenn nun der Ionenstrahl nach einem solchen Radialfeld als Energiefilter noch in einem Magnetfeld nach Massen zerlegt wird (Abb. 4),

so hat man einen Massenspektrographen, bei dem die Verwaschung der Linien, die durch die ungleichen Energien der Ionen entstehen würden, beseitigt ist. Je enger die Blende S_2 gewählt wird, desto homogener wird die Energie der durch sie ausgefilterten Ionen und desto schärfer werden die Linien. Durch die Verengung der Blende S_2 wird aber auch die Intensität des Ionenstrahls herabgedrückt und dadurch die Nachweisempfindlichkeit des Massenspektrographen heruntergesetzt. Das ist ein empfindlicher Nachteil. Es war daher ein wesent-

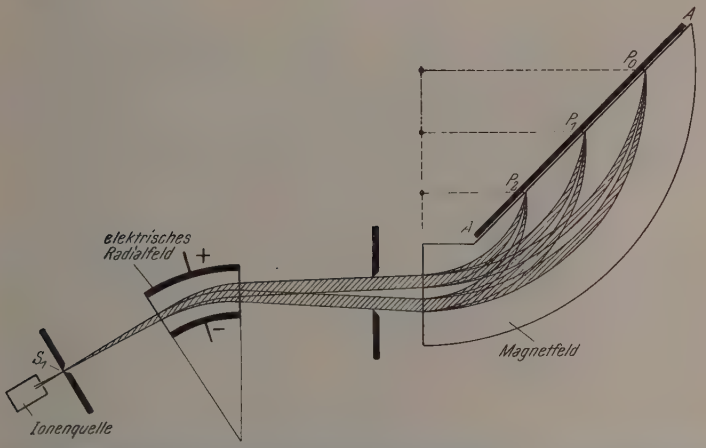


Abb. 5. Doppeltfokussierender Massenspektrograph nach *Mattauch* und *Herzog*. Es entstehen scharfe Linien auf der Photoplatte, auch wenn Ionen etwas verschiedener Energie in verschiedenen Richtungen durch den Eintrittsschlitz des Massenspektrographen kommen

licher Fortschritt, daß es durch einen Kunstgriff gelang, auch Ionenstrahlen verschiedener Energie zu einem scharfen Bild zu vereinigen. In Abb. 5 ist der Strahlengang in einem solchen verbesserten Apparat zu sehen. Hier ist durch besondere Dimensionierung des elektrischen und magnetischen Ablenkfeldes erreicht worden, daß nicht nur Strahlen, die in verschiedenen Richtungen durch den Eintrittsschlitz kommen, auf der Photoplatte zu einer scharfen Linie vereinigt werden, sondern auch Ionen, die verschiedene Energien besitzen. Man nennt solche Apparate, bei denen sowohl eine Abweichung in der Richtung als auch in der Energie von einem vorgegebenen Sollwert auf die Linienschärfe keinen Einfluß hat, doppeltfokussierende Apparate. Das Prinzip der Doppelfokussierung ist vor etwa 20 Jahren im Physikalischen Institut der Universität in Wien von *Mattauch* und *Herzog*[2] und etwa gleichzeitig auch in Amerika von *Dempster*[1, 3] und von *Bainbridge* und *Jordan*[4] entwickelt worden und hat sich in der Massenspektroskopie außerordentlich bewährt. Abb. 5 zeigt den Strahlengang in einem *Mattauch-Herzog-*

schen doppeltfokussierenden Massenspektrographen, der gegenüber allen anderen doppeltfokussierenden Apparaten den Vorzug besitzt, daß Doppelfokussierung gleichzeitig für alle Massen erfolgt und außerdem die Bilder für die verschiedenen Massen auf einer Geraden liegen. Die doppeltfokussierenden Apparate lassen hohes Auflösungsvermögen mit hoher Intensität erreichen, und man kann bei ihnen Ionenquellen verwenden, die Ionen verschiedener Energien liefern.

Ionennachweis

Wenn der Ionennachweis mit Hilfe einer Photoplatte erfolgt, so spricht man von Massenspektrographen, wenn der Nachweis elektrometrisch erfolgt von Massenspektrometern. Für den photographischen Nachweis eignen sich gelatinearme Platten, die von *Aston* zusammen

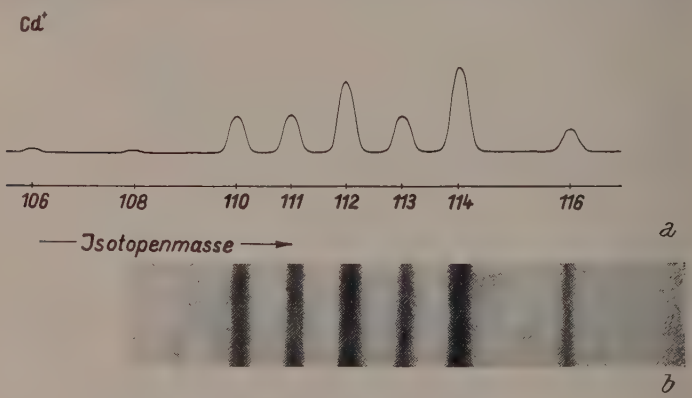


Abb. 6. Massenspektren von Cadmium
a) elektrometrisch, *b*) photographisch aufgenommen

mit der Firma Ilford für diesen Zweck entwickelt wurden und als Q-Platten im Handel erhältlich sind. Beim elektrometrischen Nachweis fängt man das Massenspektrum auf einem Metallschirm auf, in dem sich ein dünner Schlitz befindet, hinter dem ein Auffänger steht. Der Auffänger ist mit dem Gitter der Eingangsröhre eines Gleichstromverstärkers in Verbindung. Wenn Ionen durch den Schlitz auf den Auffänger treffen, so zeigt ein mit dem Verstärker verbundenes Meßinstrument einen Ausschlag. Ändert man das Magnetfeld, so wandert das Massenspektrum über den Endschlitz hinweg und bei jeder Masse, die durch den Schlitz hindurchtritt, zeigt das Instrument einen Ausschlag, der der Häufigkeit, mit der diese Masse im Ionenstrahl vorkommt, proportional ist. Die Abb. 6*a* zeigt ein solches elektrometrisch aufgenommenes Massenspektrum von Cadmium, Abb. 6b zum Vergleich dazu ein photographisch

aufgenommenes Cadmiumspektrum. Elektrometrisch kann man noch Ströme in der Größenordnung zwischen 10^{-15} und 10^{-16} *A* nachweisen. Wenn man Sekundäremissionsverstärker verwendet, kann die Nachweisgrenze noch um einen Faktor 100 bis 1000 gesteigert werden. Unter günstigen Umständen kann man mit Sekundäremissionsverstärkern noch einzelne Ionen zählen. In Abb. 7 ist ein solcher Sekundäremissionsverstärker

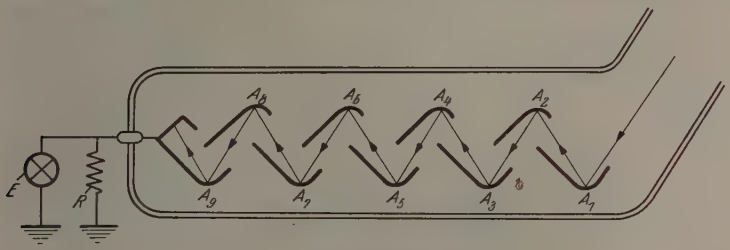


Abb. 7. Sekundäremissionsverstärker

schematisch dargestellt. Die Ionen treffen auf die erste Elektrode auf, lösen dort Sekundärelektronen aus, die durch eine Spannung von etwa 300 Volt gegen die zweite Elektrode beschleunigt werden. Dort lösen sie ebenfalls Sekundärelektronen aus, die auf die dritte Elektrode fallen usw. Wenn der Sekundäremissionskoeffizient der Elektroden so groß ist, daß mehr Elektronen emittiert werden als auftreffen, so wird der einfallende Ionenstrom verstärkt. Man kann so noch Ströme bis etwa 10^{-18} *A* nachweisen und unter Umständen sogar noch einzelne Ionen zählen. Zum Nachweis der kleinsten Substanzmengen, die massenspektroskopisch bisher nachgewiesen werden können, müssen Sekundäremissionsverstärker verwendet werden.

Gasanalysen

Am besten durchgebildet sind die massenspektroskopischen Verfahren für Gasanalysen. Man verwendet dazu am besten einfach fokussierende Massenspektrometer mit einer Elektronenstoß-Ionenquelle. Die Gasprobe wird dann aus einem Vorratsgefäß über einen hohen Strömungswiderstand in die Ionenquelle eingelassen, das Magnetfeld eingeschaltet und langsam gesteigert und dabei die einzelnen Massenlinien registriert. Nehmen wir an, wir hätten ein einfaches Gas, z. B. Kohlendioxyd, dann wird man eine Linie bei der Massenzahl 44 beobachten, die vom Ion des CO_2-Moleküls herrührt und außerdem noch Linien bei den Massenzahlen 32, 28, 16 und 12, die von den Ionen der Bruchstücke O_2, CO, O und C des CO_2-Moleküls herrühren. Die Häufigkeitsverteilung, mit der diese Linien auftreten, ist unter festgelegten Betriebsbedingungen in der Ionenquelle für das CO_2-Molekül ganz charakteristisch. Bei komplizierteren Molekülen, wie z. B. bei den Molekülen der Kohlenwasserstoff-

verbindungen, ist die Zahl der beobachteten Bruchstücke viel größer. In Abb. 8*a*, *b*, *c* sind als Beispiele die Massenspektren von Methan, Äthan und Propan zu sehen. Diese Spektren sind stets charakteristisch für das Molekül, von dem sie stammen, und man kann aus dem Massenspektrum erkennen, welche Substanz in die Ionenquelle des Instrumentes eingelassen wurde. Da außerdem die Intensität der Massenlinien dem Druck im Vorratsgefäß proportional ist, kann auch der Druck im Vorratsgefäß aus dem Massenspektrum abgelesen werden. Das Massenspektrometer muß dazu allerdings erst geeicht werden, und zwar für jedes der vorhandenen Gase, da wegen der verschiedenen Ionisierungswahrscheinlichkeiten die Eichkonstante von Gas zu Gas variiert. Bei Gasgemischen überlagern sich im Massenspektrum die einzelnen Komponenten linear, solange der Druck in der Ionenquelle nicht zu groß wird. Die Analyse eines Gasgemisches ist dann mit der Aufgabe verbunden, das Massenspektrum der Mischung in seine einzelnen Komponenten zu zerlegen. Da dazu auch die Eichspektren der einzelnen Komponenten aufgenommen werden müssen, läuft diese Aufgabe im Wesentlichen darauf hinaus, ein lineares Gleichungssystem von n Gleichungen mit n Unbekannten aufzulösen. In der Regel versucht man dabei, das Massenspektrum von den schweren Massen her aufzuspalten. In dem in Abb. 8c gezeigten Beispiel stammen die Linien zwischen den Massen 40 und 45 vom Propan allein. Aus ihrer Intensität kann man den Partialdruck des Propans im Vorratsgefäß ermitteln und dann aus dem charakteristischen Spektrum des Propans auch den Propananteil der übrigen Linien ermitteln. Zieht man diesen Anteil vom Spektrum der Mischung ab, so bleiben nur Linien übrig, die vom Äthan und Methan herrühren. Die Linien zwischen den Massenzahlen 25 und 30 (s. Abb. 8) in diesem Restspektrum stammen nur vom Äthan allein, das nun ähnlich

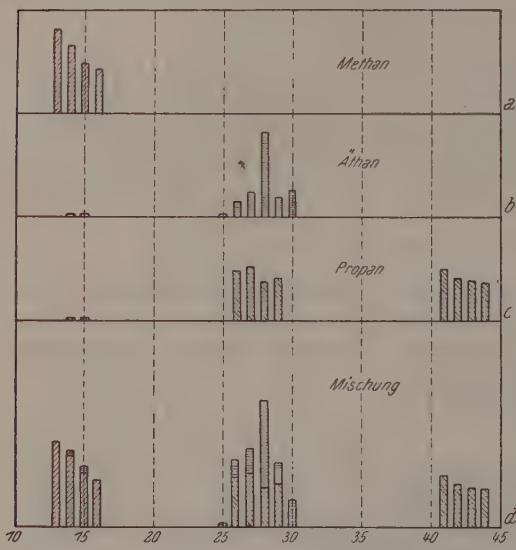


Abb. 8. *a*), *b*), *c*) Massenspektren von Methan, Äthan und Propan, *d*) Massenspektrum einer Mischung aus den drei obigen Komponenten

wie vorher das Propan bestimmt werden kann. Subtrahiert man auch den Äthananteil vom Spektrum der Mischung, so bleiben in diesem absichtlich sehr einfach gewählten Beispiel nur die Methanlinien übrig.

Besonders zur quantitativen Analyse von Kohlenwasserstoffgemischen haben sich Massenspektrometer sehr bewährt und finden dazu auch eine immer weitere Verbreitung in der Industrie. Man kann auf diese Weise mit kleineren Substanzmengen in viel kürzerer Zeit Analysen durchführen, als das nach den bisherigen Methoden der organischen Chemie der Fall war. Besonders für die Bedürfnisse der Petroleumindustrie sind Verfahren ausgearbeitet worden, um mit käuflichen Instrumenten solche Analysen organischer Dämpfe durchzuführen.

Mit dem Massenspektrometer kann man auch sehr geringe Gasmengen nachweisen und auf ihre Zusammensetzung untersuchen. Hat man von einem Gasgemisch etwa ½ ml zur Verfügung, so ist es bequem möglich, den ganzen Bereich von der Masse 1 bis etwa 300 durchzusuchen. Kann man sich auf den Nachweis weniger Komponenten beschränken, so kann man unter Umständen noch mit 10^{-4} bis 10^{-5} ml Gas auskommen und wenn zum Ionennachweis ein Sekundäremissionsverstärker benutzt wird, noch mit 10^{-7} bis 10^{-8} ml. Durch besondere Maßnahmen ist es auch schon gelungen, die Nachweisgrenze für ein Edelgas, das in 10^{-3} ml eines anderen Gasgemisches vorhanden ist, auf etwa 10^{-13} ml herabzusetzen.

Der Nachweis und die Untersuchung so kleiner Gasmengen ist vor allem an Edelgasen durchgeführt worden, die durch Atomumwandlungen entstanden sind, wie z. B. Helium, das beim Zerfall des Urans durch die natürliche α-Aktivität entsteht, von Helium oder Neon, das durch die kosmische Strahlung in Metheoriten gebildet wird, von Argon, das durch radioaktiven Zerfall von Kalium gebildet wird, von Krypton und Xenon, die aus Uran durch Kernspaltung entstehen, oder von Xenon, das durch einen neu aufgefundenen doppelten β-Zerfall in alten Tellurmineralien nachgewiesen wurde. In diesen Fällen erkennt man auch sofort, daß diese Edelgasspuren durch Kernreaktionen entstanden sein müssen, da sie andere Isotopenzusammensetzungen besitzen als die Edelgase in der Atmosphäre.

Feste Stoffe

Man kann auch die Massenspektren fester Körper zu quantitativen Analysen verwenden, doch sind die dazu notwendigen Verfahren noch nicht so gut entwickelt wie bei Gasanalysen. Meist wird dazu ein *Hochfrequenzfunken* benutzt. Weil dann die Ionen verschiedene Energien besitzen, muß ein doppeltfokussierender Apparat verwendet werden. Beim Hochfrequenzfunken werden die Substanzen verdampft, ohne daß eine Fraktionierung einsetzt. Zumindest ist bis jetzt bei eigens

dafür angestellten Untersuchungen noch keine Fraktionierung nachgewiesen worden. Am besten eignet sich das Verfahren zur Bestimmung von geringen Zusätzen oder Verunreinigungen in einem Metall. Man muß auch hier zuerst mit Hilfe eines Massenspektrums von einer Probe bekannter Zusammensetzung eine Eichung durchführen, bevor die einzelnen Komponenten quantitativ bestimmt werden können. In Abb. 9*a* und *b* sind an einer Reihe von Edelstahlproben die chemisch bestimmten Chrom- und Nickelgehalte mit den massenspektroskopisch bestimmten Werten

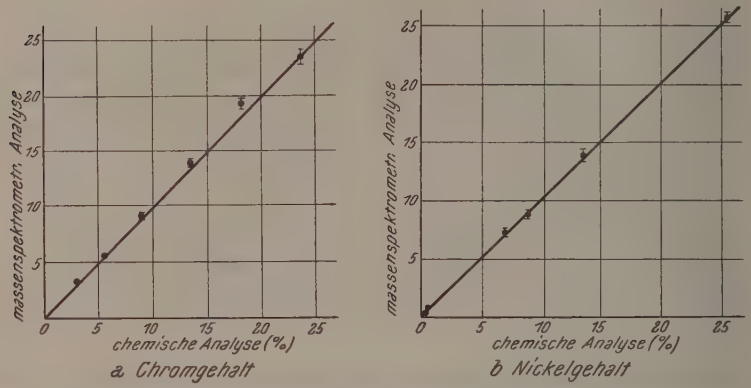


Abb. 9. Vergleich zwischen den massenspektroskopischen und den chemischen Analysenergebnissen. *a*) bei Chrom- und *b*) beim Nickelgehalt einer Edelstahlprobe (*Gorman*, *Jones* und *Hipple*[11])

verglichen. Man sieht, daß die Analysen innerhalb der Meßfehler miteinander recht gut übereinstimmen und daß die Genauigkeiten, mit der die Konzentrationen der einzelnen Komponenten bestimmt worden sind, einige Prozent beträgt. Bei niedrigen Konzentrationen sinkt die Genauigkeit allerdings ab. Diese Stahlanalysen wurden mit einem doppeltfokussierenden Massenspektrometer gemacht, der Ionennachweis erfolgte also auf elektrischem Wege. Wenn sehr geringe Verunreinigungsspuren in einem Metall nachgewiesen werden sollen, ist es zweckmäßiger eine Photoplatte zum Ionennachweis zu verwenden. Die Abb. 10 zeigt ein Massenspektrum von den leichten Elementen, die als Verunreinigungen in einer Uranprobe enthalten sind. Es handelt sich hier um eine von *Dempster*[12]) durchgeführte Eichaufnahme von einer Probe bekannter Zusammensetzung. Die Expositionszeit war 3 Minuten und es sind dazu im Funken 10 mg Uran verbraucht worden. Die Konzentration, mit der diese Verunreinigungsspuren im Uran vorhanden sind, liegt in der Größenordnung 10^{-3} bis 10^{-5}%. Die genauen Daten sind aus der Tabelle 1 zu entnehmen. In der ersten Spalte ist der chemisch bestimmte Spurengehalt angegeben, und zwar in Einheiten von 10^{-6} Teilen vom Gesamtgewicht,

in der zweiten Spalte der Uranverbrauch im Funken, der nötig war, um eine nachweisbare Spuren-Linie zu geben, und zwar in mg, und in der dritten Spalte ist die Menge des betreffenden Spuren-Elementes in g eingetragen, die im Funken verbraucht werden müßte, um eine nachweis-

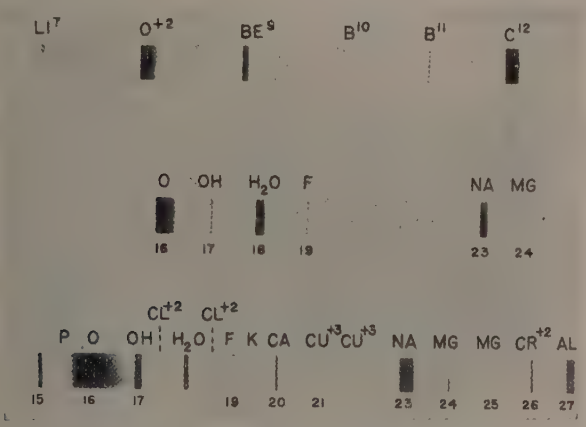


Abb. 10. Verunreinigungsspuren leichter Elemente in einer Uranprobe nach *Dempster*. Siehe *Inghram*[12]

Tabelle 1

Gehalt an leichten Elementen als Verunreinigungen in der massenspektrographisch untersuchten Uranprobe (siehe Abb. 10). Spalte 1: Gehalt in 10^{-4}% (chemisch bestimmt). Spalte 2: Elektrodenverbrauch in mg bis die Linie im Massenspektrum erscheint. Spalte 3: Nachweisbare Menge in g (nach *Dempster*, siehe *Inghram*[12])

Verunreinigung	1	2	3
^{7}Li	5	.	.
^{9}Be	0,02	2,0	$0{,}4 \cdot 10^{-10}$
^{10}B	0,3	0,4	$1{,}2 \cdot 10^{-10}$
^{13}C	4	0,2	$8 \cdot 10^{-10}$
^{14}N	24	0,01	$2{,}4 \cdot 10^{-10}$
^{16}O	40	0,002	$0{,}8 \cdot 10^{-10}$
^{19}F	1,1	0,08	$0{,}9 \cdot 10^{-10}$
^{23}Na	10	0,005	$0{,}5 \cdot 10^{-10}$
^{24}Mg	14	0,025	$3{,}5 \cdot 10^{-10}$

bare Linie zu zeigen. Ähnlich wie in der optischen Spektroskopie variiert die Nachweisempfindlichkeit von Element zu Element, allerdings weitaus nicht in so hohem Maße wie bei optischen Spektren. Die Streuung beträgt kaum mehr als eine Größenordnung. Für alle diese Elemente muß

man etwa 10^{-10} bis 10^{-11} g im Funken verbrauchen, um nachweisbare Linien im Massenspektrum zu erhalten. In Abb. 11 sind Massenspektren von reinem Blei, von reinem Aluminium und in der untersten Figur ein Massenspektrum von Germanium zu sehen, dem $3 \cdot 10^{-6}$ Teile Antimon zugesetzt waren. Diese Aufnahmen sind von *Hannay*[13] mit einem doppeltfokussierenden Massenspektrographen vom Mattauch-Herzog'schen Typ aufgenommen. Die Grenze für den Nachweis mit Empfindlichkeit bei

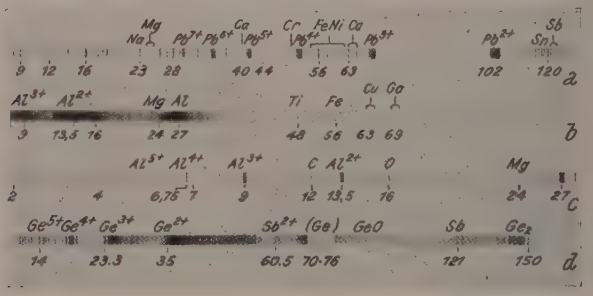


Abb. 11. Massenspektren
a von „reinem Blei", *b*) und *c*) von „reinem Aluminium" und *d*) von Germanium mit $3 \cdot 10^{-6}$ Teilen Antimonzusatz (*Hannay*[13])

diesen Untersuchungen ist vor allem durch zwei Ursachen gegeben: 1. durch Störlinien, die aus dem Restgas der evakuierten Apparatur stammen und 2. durch einen allgemeinen Streuuntergrund in der Umgebung sehr intensiver Linien. In der unmittelbaren Umgebung der Massenlinien des Urans ist der Spurennachweis viel unempfindlicher, weil hier bei langer Belichtung die Uranlinien selbst sich zu einem breiten Fleck ausdehnen, der die Nachbarlinien überdeckt.

Es sei nochmals betont, daß bei Untersuchungen mit einem Hochfrequenzfunken als Ionenquelle, ein Apparat mit Energiefilter verwendet werden muß; am zweckmäßigsten also ein doppeltfokussierender Apparat. Obwohl die Firmen, die einfach fokussierende Massenspektrometer herstellen, mit der Entwicklung käuflicher doppeltfokussierender Apparate begonnen haben, sind zur Zeit noch keine solchen Instrumente im Handel zu erhalten und Analysen dieser Art sind daher auf Laboratorien beschränkt, die sich ihre Instrumente selbst bauen.

Man kann zur Untersuchung von festen Körpern auch die Ionen mit Elektronenstoß herstellen, dann muß man aber die Proben im Vakuum aus einem elektrisch geheizten Öfchen in den Stoßraum der Ionenquelle hineindampfen. Da dabei eine Fraktionierung der einzelnen Komponenten eintritt, muß die gesamte Probe vollständig verdampft und die Inten-

sität der einzelnen Massenlinien als Funktion der Zeit aufgenommen werden. Die von dieser Intensitätskurve und der Zeitachse eingeschlossene Fläche, ist ungefähr proportional der verdampften Substanzmenge. Das Verfahren ist nicht sehr genau, kann aber sehr empfindlich sein. Auch mit thermischen Ionenquellen kann man solche Untersuchungen durchführen. Wie empfindlich dieses Verfahren sein kann, ist aus Abb. 12 zu ersehen. Hier wurden verschieden große Rubidiumproben verdampft und der bei Rubidium 85 beobachtete Ausschlag im Massenspektrometer als Funktion der Zeit aufgetragen. Wir haben nach einigen Verbesserungen ohne Sekundäremissionsverstärker noch gut 10^{-13} g Rb nachweisen können. Wenn man zum Ionennachweis einen Sekundäremissionsverstärker verwenden würde, könnte man die gleichen Meßkurven noch mit etwa 1000mal weniger Substanz erhalten.

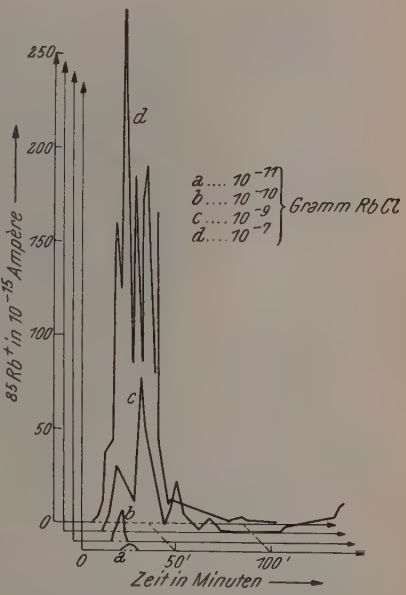


Abb. 12. Ausschläge im Massenspektrometer als Funktion der Zeit, wenn verschieden große Mengen Rubidium untersucht werden

Verdünnungsanalysen

Ein Analysenverfahren, das besonders auf die Erfordernisse der Massenspektroskopie zugeschnitten ist und mit dem sehr kleine Substanzmengen recht genau bestimmt werden können, ist das Isotopenverdünnungsverfahren. Wir wollen uns die Grundzüge dieses Verfahrens an einem einfachen Beispiel klarmachen. Nehmen wir an, in irgend einer Probe, die aus einem Gemisch verschiedener Substanzen bestehen kann, sei eine kleine Menge von x Atomen Silber enthalten. Diese unbekannte Menge x soll bestimmt werden. Natürliches Silber hat zwei Isotope mit den Massenzahlen 107 und 109, die gleich häufig in der Natur auftreten. Das Massenspektrum von gewöhnlichem Silber besteht also aus zwei gleich intensiven Linien (Abb. 13*a*). In unserer Probe sind $\frac{1}{2}x$ Atome ^{107}Ag und $\frac{1}{2}x$ Atome ^{109}Ag enthalten. Wir geben nun y Atome Silber hinzu, das nur aus dem Isotop ^{107}Ag besteht und dessen Massenspektrum aus einer einzigen Linie besteht, wie die Abb. 13*b* zeigt. In unserer Probe sind dann $\frac{1}{2}x + y$ Atome ^{107}Ag und $\frac{1}{2}x$ Atome ^{109}Ag enthalten. Wenn wir die Probe gut durchmischen, etwas Silber abtrennen (die Abtrennung braucht nicht quantitativ vorgenommen zu werden), so wird im Massen-

spektrum ein Häufigkeitsverhältnis von ^{107}Ag zu ^{109}Ag von $h = \frac{^1/_2 x - y}{^1/_2 x}$ beobachtet und daraus kann die unbekannte Silbermenge

$$x = \frac{2y}{2h-1}$$

bestimmt werden. Damit ist die zu bestimmende Menge eines Elementes im wesentlichen auf eine Isotopenhäufigkeitsbestimmung zurückgeführt.

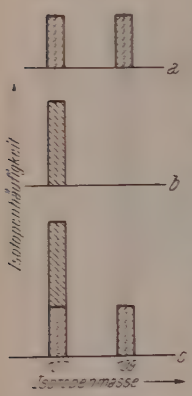


Abb. 13. Zur Verdünnungsanalyse. Massenspektrum von Silber. *a* normales Silber, *b* angereichertes Silber, *c* Mischung

Die Menge des zugegebenen angereicherten Isotops wird man in der Regel volumetrisch unter Verwendung einer Lösung genau bekannter Konzentration durchführen. Dabei stößt man allerdings auf eine gewisse Schwierigkeit. Die Konzentration dieser Lösung soll möglichst genau bekannt sein, andererseits hat man aber in der Regel von dem angereicherten Isotop nur eine geringe Menge zur Verfügung, sodaß eine genaue Wägung nur schwer durchführbar ist. Außerdem ist der Reinheitsgrad der angereicherten Isotope nicht immer sehr hoch. Man kann sich dann folgendermaßen helfen. Man stellt sich vom natürlichen Isotopengemisch des Elementes, mit dem man arbeitet, eine möglichst genaue Standardlösung her und mischt eine bekannte Menge davon mit einem bekannten Volumen der Lösung des angereicherten Isotopes, deren Konzentration zunächst noch unbekannt ist, und bestimmt sowohl in den beiden Ausgangslösungen als auch von der Mischung das Isotopenverhältnis. Auf unser Beispiel übertragen würde das bedeuten, man macht zunächst vom ^{107}Ag eine Lösung und mischt ein bekanntes Volumen dieser angereicherten Lösung mit einem bekannten Volumen der Standardlösung eines Silbersalzes von normaler Isotopenzusammensetzung. Dann bestimmt man die Isotopenhäufigkeiten des Silbers in den beiden Ausgangslösungen und in der Mischung und kann nach dem Isotopenverdünnungsverfahren die Konzentration der Lösung mit dem angereicherten Silberisotop bestimmen. Wir können dann ebenfalls die oben abgeleitete Gleichung anwenden, nur wird jetzt in unserer Gleichung die Größe x als bekannt vorausgesetzt und y bestimmt. Auf diese Weise kann man die Konzentration auch recht kleiner Mengen von den Indikatorisotopen mit genügender Genauigkeit bestimmen. Im Prinzip kann das Verdünnungsverfahren bei allen Elementen angewendet werden, die mehr als ein stabiles Isotop besitzen und das sind immerhin etwa 70% der Elemente des periodischen Systems. Eine andere Frage ist es, ob man auch die dazu notwendigen, angereicherten

Isotope bekommt. Auf diesem Gebiet haben sich aber in den letzten Jahren auch für europäische Wissenschaftler die Verhältnisse wesentlich gebessert. Während des Krieges hat man zur Trennung der Uranisotope in den Vereinigten Staaten besonders intensitätsstarke Massenspektrographen entwickelt, mit denen getrennte Isotope in wägbaren Mengen hergestellt werden können. Nach dem Kriege sind sowohl in Amerika als auch in England und neuerdings auch in anderen Ländern einige solche Massentrenner zur Trennung der Isotope möglichst vieler Elemente für wissenschaftliche Zwecke in Betrieb genommen worden. Man kann in Amerika von etwa 50 verschiedenen Elementen ca. 200 angereicherte stabile Isotope erhalten und aus Harwell in England sind zur Zeit von etwa 15 verschiedenen Elementen etwa 60 verschiedene angereicherte Isotope zu haben.

Es ist außerdem möglich, in Kernreaktoren durch Bestrahlung bestimmter Elemente mit Neutronen sehr reine Proben von einzelnen stabilen Isotopen mancher Elemente herzustellen. Wenn man z. B. Gold, das ja ein Reinelement darstellt, und nur ein stabiles Isotop mit der Masse 197 besitzt in einem Pile mit Neutronen bestrahlt, so spielt sich folgender Vorgang ab:

$$^{197}\mathrm{Au} + \mathrm{n} \longrightarrow {}^{198}\mathrm{Au} \xrightarrow{\beta} {}^{198}\mathrm{Hg}$$

Es entsteht ein stabiles Isotop des Quecksilbers, und zwar in viel reinerer Form als nach jedem Isotopentrennverfahren.

Wirklich durchgeführt sind solche Verdünnungsanalysen allerdings bis jetzt bei nicht viel mehr als zwei Dutzend verschiedener Elemente. Die ersten massenspektroskopischen Verdünnungsanalysen sind von *Rittenberg* und *Schönheimer*[14] gemacht worden, die mit Hilfe von angereichertem schweren Stickstoff Aminosäuren in komplizierten organischen Stoffgemischen quantitativ bestimmten und damit sehr wesentliche Erkenntnisse über den Eiweißstoffwechsel im lebenden Organismus erzielen konnten. Sie haben dazu mit angereichertem ^{15}N die zu bestimmende Aminosäure synthetisch hergestellt, eine bekannte Menge davon der zu analysierenden Substanz zugefügt, gut durchmischt und dann die zu bestimmende Säure wieder abgetrennt. Der Stickstoff aus der abgetrennten Probe wurde dann massenspektroskopisch analysiert. Es war dabei ein besonderer Vorteil, daß die Abtrennung der Aminosäure aus dem Stoffgemisch nicht quantitativ durchgeführt zu werden brauchte, weil eine quantitative Abtrennung in diesem Fall gar nicht durchführbar gewesen wäre.

Von *Grosse*, *Hindin* und *Kirshenbaum*[15-17] sind Elementaranalysen der Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel nach der Verdünnungsmethode durchgeführt worden. Bei der Sauerstoffbestimmung zum Beispiel wird eine gewogene Menge der zu analysierenden

Substanz in einem Reaktionsgefäß aus Platin, zusammen mit einer bekannten Menge von Sauerstoff, bei dem das schwere Isotop ^{18}O angereichert ist, ca. 15 Minuten lang auf 800° erhitzt. Dabei tritt ein Austausch der Sauerstoffatome zwischen dem markierten Sauerstoff und der zu analysierenden Probe ein. Dann wird dem Reaktionsgefäß Sauerstoff entnommen, im Massenspektrometer die Isotopenhäufigkeiten gemessen, und aus der Verdünnung, die das Indikatorisotop durch den Austausch erlitten hat, die Sauerstoffmenge in der zu analysierenden Probe bestimmt. Ein Platingefäß muß bei einer solchen Sauerstoffbestimmung verwendet werden, weil bei Verwendung von Porzellan oder Glas der Sauerstoff der Gefäßwand bei den hohen Temperaturen an dem Isotopenaustausch mit teilnehmen würde und dadurch Fälschungen der Analyse entstünden. Um die Zuverlässigkeit und die Genauigkeit dieser Verfahrens zu prüfen, sind von *Grosse Hindin* und *Kirshenbaum* Proben von reinster Ameisensäure, Essigsäure, Nitroäthan und Äthylester analysiert worden. In Tab. 2 sind die Ergebnisse zusammengestellt. In der vorletzten Zeile sind die Ergebnisse nach der Verdünnungsmethode aufgeführt, in der letzten Zeile die

Tabelle 2

Zur Sauerstoffbestimmung in organischen Substanzen nach der Verdünnungsmethode (*Grosse, Hindin, Kirshenbaum*[17])

Substanz	Essigsäure	Nitroäthan	Äthyläther
Substanzmenge in mg	26,0	20,9	52,7
Angereicherter Sauerstoff in mg	36,5	31,4	12,03
Gemessene O_2-Menge (%)	53,4	40,3	19,8
O_2 berechnet aus der bekannten Zusammensetzung	53,3	42,6	21,6

aus der bekannten Zusammensetzung der Proben berechneten Werte eingetragen. Die Übereinstimmung bei solchen Vergleichen liegt in der Regel in der Größenordnung von 1%. In ähnlicher Weise sind Elementaranalysen von Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel überprüft und als brauchbar befunden worden.

Verdünnungsanalysen haben sich sehr gut bei der quantitativen Bestimmung der geringen Substanzmengen bewährt, die beim natürlich radioaktiven Zerfall oder bei künstlichen Atomumwandlungen entstehen.

Das Rubidiumisotop der Masse 87 ist radioaktiv und wandelt sich durch β-Emission in ein Strontiumisotop der Masse 87 um. Man kann mit Hilfe dieses radioaktiven Prozesses das Alter rubidiumhaltiger Minerale bestimmen und muß dazu den Rubidium- und den Strontiumgehalt im Mineral ermitteln. Die quantitative Bestimmung der kleinen Strontiummengen ist nicht ganz einfach und *Hahn* und *Straßmann*[18],

die zum erstenmal radiogenes Strontium aus einem Mineral abgeschieden haben, mußten größenordnungsmäßig 1 Kilogramm aufarbeiten, um genügend Strontium für eine quantitative Analyse zu bekommen. Daß das abgeschiedene Strontium wirklich radiogen war, haben dann *Mattauch* und *Hauk*[19] massenspektroskopisch bewiesen. Man geht neuerdings dazu über, den Rubidium- und Strontiumgehalt massenspektroskopisch durch Verdünnungsanalysen zu bestimmen. Das Mineral wird aufgeschlossen, es werden einige μg elektromagnetisch angereichertes ^{87}Rb und ^{84}Sr zugesetzt, dann sowohl Rubidium als auch Strontium abgeschieden und die Isotopenhäufigkeiten gemessen. Ganz ähnlich wie im Beispiel des Silbers kann man aus der Verdünnung der Indikatorisotope den Rubidium- und den Strontiumgehalt im Mineral ermitteln. Während *Hahn* und *Straßmann* Kilogrammengen aufarbeiten mußten, kann man hier mit einigen Gramm des Minerals auskommen. Für die massenspektroskopische Untersuchung genügen Mikrogrammbeträge von diesen beiden Elementen.

Ein anderes Beispiel: Das Kaliumisotop der Masse 40 ist radioaktiv und wandelt sich durch Aussendung eines β-Strahls in ^{40}Ca oder durch Einfang eines Elektrons aus der K-Schale in ein Argonatom der Masse 40 um. Um das Verhältnis der Zerfallswahrscheinlichkeiten zu ermitteln, muß man die in einer bestimmten Zeitspanne radiogen gebildete Argon- und Calciummenge bestimmen. Das ist von *Inghram* und Mitarbeitern unter Verwendung von ^{36}A und ^{48}Ca als Indikatorisotope durchgeführt worden, wobei sich für das Verzweigungsverhältnis der Wert $\frac{\lambda^+}{\lambda^-} = 0{,}1263 \pm$ $\pm$ 0,0027 ergab.

Und noch ein drittes Beispiel, bei dem allerdings das normale Verdünnungsverfahren umgekehrt worden ist[21]). Rhenium hat ein Isotop der Masse 187, das eine sehr schwache β-Aktivität zeigt und sich dabei in Osmium umwandelt. In einem rheniumhaltigen Mineral muß sich daher im Laufe der Zeit Osmium bilden, das aber allein aus Osmium der Masse 187 besteht, während normales Osmium noch sechs weitere stabile Isotope besitzt. Wir haben zu einer bekannten Menge eines rheniumhaltigen Minerals 147 μg gewöhnliches Osmium hinzugegeben, dann das Osmium vom Mineral abgetrennt und im Massenspektrometer untersucht. In der Abb. 14b sehen sie ein Massenspektrum des gewöhnlichem Osmiums, in der Abb. 14a ein Massenspektrum von dem Osmium, das aus dem Mineral abgeschieden wurde. Die kleinen Ausschläge bei den Massen 220 bis 224 kommen von den 147 μg normalen Osmiums, die absichtlich zum Mineral zugefügt wurden und man kann aus den Häufigkeitsverhältnissen der Osmium-Isotope sofort den Schluß ziehen, daß mindestens 2,1 mg Osmium radiogen aus dem Rhenium entstanden sein müssen, in

guter Übereinstimmung mit der rein chemischen Analyse. Wenn, was in unserem Beispiel nicht der Fall war, das radiogene Osmium schon im Mineral durch gewöhnliches Osmium verunreinigt ist, so muß durch eine weitere Isotopenhäufigkeitsbestimmung der Anteil dieser Verunreinigung

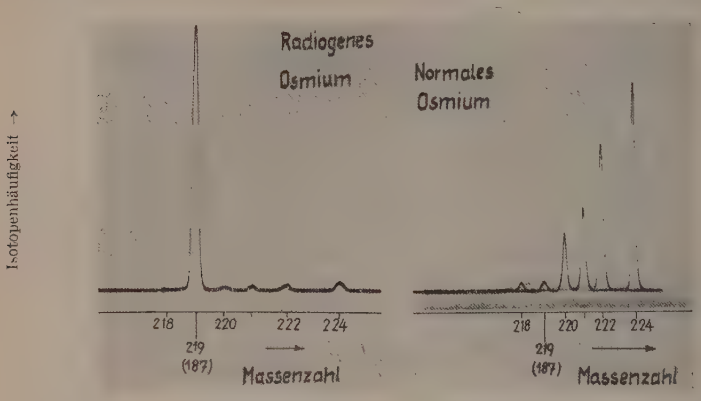


Abb. 14 *a*

Abb. 14 *b*

Abb. 14 *a*). Massensprektrum von radiogenem Osmium mit OsO_3-Ionen gemessen

Abb. 14 *b*). Massenspektrum von normalem Osmium mit OsO_3-Ionen gemessen

bestimmt werden. Hier ist das angereicherte Isotop, das zur Ausführung der Verdünnungsanalyse benötigt wurde, von der Natur im Mineral selbst gebildet worden.

Wie kleine Substanzmengen nach dem Verdünnungsverfahren noch recht genau bestimmt werden können, zeigen vielleicht am eindringlichsten die Bestimmungen des Urangehaltes in Meteoriten, die mit Hilfe von angereichertem Uran 235 als Indikator von *Inghram* und Mitarbeitern[22] durchgeführt wurden. In Abb. 15 ist in der rechten Teilfigur ein Massenspektrum des elektromagnetisch angereicherten ^{235}U zu sehen. Das Massenspektrum ist mit UO_2-Ionen, die man auf thermischem Wege gut erhalten kann, aufgenommen worden. Die Linie bei 267 entspricht dem Ion $^{235}U^{16}O_2$. Die beiden Linien bei 268 und 269 sind hier belanglos, sie entsprechen dem ^{235}U mit den seltenen schweren Sauerstoffisotopen der Masse 17 und 18. Bei der Masse 270 ist noch ein Rest von ^{238}U zu sehen ($^{238}U^{16}O_2$), das nicht ganz abgetrennt werden konnte. Zur Uranbestimmung wurde eine bekannte Menge des Meteoriten (etwa 1 g) aufgelöst und eine bekannte Menge des angereicherten Isotops ^{235}U zugefügt (größenordnungsmäßig 1 μg). Dann ist Uran abgeschieden und im Massenspektrometer untersucht worden. Man sieht aus der linken Figur der Abb. 15 sofort, daß in der Probe des Meteoriten etwa fünfmal mehr ^{238}U

enthalten gewesen sein muß als in der zugefügten ^{235}U-Menge. Da insgesamt etwa 1 μg ^{235}U zugegeben wurde und darin, wie man aus dem Massenspektrum der rechten Teilfigur sieht, etwa $1^0/_{00}$, also ca. $1 \cdot 10^{-9}$ g ^{238}U enthalten war, sind in dem untersuchten Stück des Meteoriten etwa $5 \cdot 10^{-9}$ g Uran enthalten gewesen.

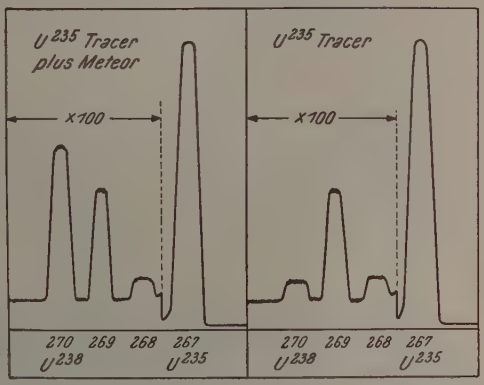


Abb. 15. Massenspektren zur Uranbestimmung in Meteoriten nach der Verdünnungsmethode *(Inghram*[21]*)*

Zusammenfassung

Nach einem kurzen Überblick über die gebräuchlichsten, in der Massenspektroskopie verwendeten Apparate werden an Hand von Beispielen die wichtigsten Analysenverfahren mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen Bestimmung sehr kleiner Substanzmengen besprochen. Dabei werden massenspektrometrische Gasanalysen, Analysen fester Körper mit dem Hochfrequenzfunken im Massenspektrographen und Analysen durch vollständiges Verdampfen der Proben im Massenspektrometer erörtert. Zum Schluß wird besonders auf die unter Verwendung von getrennten stabilen Isotopen durchgeführten Verdünnungsanalysen eingegangen. An Hand von Beispielen wird gezeigt, daß mit massenspektrometrischen Methoden Gasmengen unter 10^{-8} ml und von festen Körpern noch Mengen unter 10^{-9} g quantitativ recht genau bestimmt werden können. Die qualitative Nachweisgrenze liegt bei vielen Substanzen noch viel niedriger.

Summary

Following a short survey of the apparatus most commonly used in mass spectrosopy, a discussion is given, based on examples, of the most important analytical procedures with special reference to the quantitative determination of very small amounts of material. The discussion includes mass spectrometric gas analyses, analyses of solids through high frequency sparks, and analyses by means of complete volatilization of the samples in the mass spectrometer. In conclusion, special attention is paid to dilution analyses conducted with the aid of separated stable isotopes. By means of examples it is shown that the use of mass spectrometric methods of analysis makes it possible to determine accurately quantities of gas below 10^{-8} ml and amounts of solids as small as 10^{-9}g. The qualitative limits of detection are much lower still in numerous cases.

Résumé

Après un rapide aperçu concernant les appareillages de spectroscopie de masse les mieux utilisables, l'auteur décrit à l'aide d'exemples les techniques analytiques les plus importantes en s'attachant particulièrement à la détermination quantitative de très faibles quantités de substances. A cette occasion, il évoque les analyses de gaz par spectrométrie de masse, les analyses de corps solides par l'étincelle haute fréquence dans les spectrographes de masse et les analyses par vaporisation complète de l'échantillon dans un spectromètre de masse. Finalement, on décrit particulièrement les analyses par dilution avec emploi d'isotopes stables préalablement séparés.

Les exemples montrent que les méthodes d'analyse des gaz par spectrométrie de masse permettent de déterminer avec précision des volumes de gaz inférieurs à 10^{-8} ml, et des quantités de substances solides inférieures à 10^{-9} g. La limite d'identification qualitative est encore beaucoup plus faible pour un grand nombre de substances.

Literatur

[1] *A. J. Dempster*, Physic. Rev. **50**, 186 (1936).

[2] *J. Mattauch* und *R. Herzog*, Z. Physik **89**, 786 (1934).

[3] *A. J. Dempster*, Physic. Rev. **51**, 67 (1937).

[4] *K. T. Bainbridge* und *E. B. Jordan*, Physic. Rev. **50**, 282 (1936).

[5] *H. Hoover* und *H. W. Washburn*, Amer. Inst. Mining Metallurg. Engr., Techn. Publ. No. 1205; Calif. Oil World **34**, No. 22, 21 (1941).

[6] *H. Washburn* in Physical Methods of Chemical Analysis. Bd. **1**, S. 587, herausgeg. von *G. Berl*. New York: Academic Press. 1950.

[7] Conferences on Mass Spectrometry. The Institute of Petroleum 1950 and 1953 (publiziert 1952 und 1954).

[8] *K. I. Mayne, F. A. Paneth* und *P. Reasbeck*, Nature **172**, 200 (1953).

[9] *J. Macuamara, C. B. Collins* und *H. G. Thode*, Physic. Rev. **75**, 532 (1949).

[10] *M. G. Inghram* und *J. H. Reynolds*, Physic. Rev. **76**, 1265 (1949); **78**, 822 (1950).

[11] *J. G. Gorman, E. J. Jones* und *J. A. Hipple*, Analyt. Chemistry **23**, 438 (1951).

[12] *M. G. Inghram*, J. Physic. Chem. **57**, 809 (1953).

[13] *N. B. Hannay*, Rev. Sci. Instruments **25**, 644 (1954).

[14] *D. Rittenberg* und Mitarb., J. Biol. Chem. **133**, 737, 745 (1940). *Schönheimer, D. Rittenberg* und Mitarb., J. Biol. Chem. **127**, 285, 385 (1939); **128**, 603 (1939); **130**, 703 (1939).

[15] *A. V. Grosse, S. G. Hindin* und *A. D. Kirshenbaum*, J. Amer. Chem. Soc. **68**, 2119 (1946).

[16] *A. V. Grosse, A. D. Kirshenbaum* und *S. G. Hindin*, Science **105**, 101 (1947).

[17] *A. V. Grosse, S. G. Hindin* und *A. D. Kirshenbaum*, Analyt. Chemistry **21**, 386 (1949).

[18] *O. Hahn, F. Straßmann* und *E. Walling*, Naturwiss. **25**, 189 (1937).

[19] *J. Mattauch*, Naturwiss. **25**, 189 (1937).

[20] *G. L. Davis* und *L. T. Aldrich*, Bull. Geol. Soc. Amer. **64**, 379 (1953).

[21] *H. Hintenberger, W. Herz* und *H. Voshage*, Phys. Rev. **95**, 1690, (1954); *W. Herz, H. Hintenberger* und *H. Voshage*, Phys. Rev. **95**, 1691, (1954).

[22] *M. G. Inghram*, Ann. Rev. Nucl. Sci. **4**, 81—92 (1954).

Zusammenfassend: *Ewald-Hintenberger*, Methoden und Anwendungen der Massenspektroskopie. Weinheim: Verlag Chemie. 1953.

Chemistry Department, The Queen's University of Belfast

Ultramicroanalysis: Past, Present and Future

By

Cecil L. Wilson

(Received April 18, 1955)

Any doubt which I might have had about the topicality of ultramicroanalysis has been set at rest after a look at the programme for the present Symposium. This contains several papers which by their title obviously fall within my field: in addition it includes many others which, in spirit at least, also ought to be regarded as belonging to it. Among these, for example, I would suggest there should be numbered such long established methods as spot-test analysis, and the allied subject of trace analysis by colorimetric methods; and I would also add newer techniques such as chromatography and radioactivation, all of which ought, because of the amounts with which they can cope — covering a range of at least 10^{-6} to 10^{-10} g — to be regarded as potentially ultramicro, just as properly as those methods which have been specifically classified under this heading.

This attitude of mine may occasion some surprise, and may cause you to ask what my definition of ultramicroanalysis may be. It may even occasion some alarm, if you fear that I am about to attempt to review fully all the methods which might, in consequence of my wide-cast net, be considered appropriate.

I will therefore hasten to set your minds at rest, first by assuring you that my own personal preferences, together with a rigid time limit, will lay down quite severe boundaries outside which I do not propose to extend my detailed considerations, attractive and legitimate though it might be to stray beyond them. In the second place I will attempt to define briefly what I mean by ultramicroanalysis, thus hoping to make somewhat clearer the postulates on which I am basing my idea of the limits beyond which it would not be proper to stray. To do this it may help to look far back, if only for a moment, at the beginnings of microchemistry.

It used to be tacitly assumed that the foundations of microchemistry

were laid down around the year 1910. Historians of the subject have, however, recognised the inception of microchemical methods at a considerably earlier date; so that although we may regard as merely an historical curiosity the claims for *Pliny* as the first microchemist, it is now fairly clearly recognised that there were several pioneers in the methods in the second half of the nineteenth century. As has been pointed out elsewhere[1, 2], microchemistry can fairly be regarded at the present time as having completed a half century of active maturity, but the first stirrings of the subject can be discerned certainly at the beginning of the nineteenth century, and at least one instance is known[2] where ordinary students of chemistry were being taught in 1835 by methods which we would certainly regard as microchemical.

When I talk in this sense of microchemistry, as distinct from the classical methods of chemistry, I am using a very vague concept which covers everything right through from semimicro to ultramicro analysis, and which ought to be more precisely specified since the later development of the subject showed the necessity for a distinction of range. Any attempt to define precisely the limits of the various ranges which we have come to accept in small-scale analysis lays itself open to serious criticism, and therefore it is with some hesitation that I put forward Tables showing limits which might be accepted as indicating fairly general standards.

Table I

Scale of analysis	Approximate sample weight	Approximate sample volume
"Classical" or "Gram"	10 —0.05 g	250—10 ml
Semimicro or Centigram.....	0.05—0.005 g	10 —0.5 ml
Full micro or Milligram	5 —0.1 mg	0.5 —0.02 ml
Ultramicro or Microgram	100 —0.1 μg	20 —0.1 μl

This set of limits can be very much simplified, as shown in Table II, to give us a useful set of orienting approximations.

In Table I both upper and lower limits have been set for the range which I am arbitrarily calling the microgram range. The upper limit I will consider later, but for the moment let us look at the lower limit.

It will be seen that the quantities involved in the microgram range must be regarded as covering many of the reactions of spot-test analysis, and therefore as putting the early history of ultramicroanalysis almost as far back as that of microanalysis. In addition, to take only a couple of examples at random, many chromatographic separations deal with quantities of the order of a fraction of a microgram. And the relatively new

technique of radioactivation enables the detection and determination of quantities even smaller than may be possible by the use of spot-tests or colorimetric methods —10^{-12} g or less. Practically, therefore, the lower limit of Table I is an arbitrary one.

Table II

Type of analysis.	Mean sample weight g	Mean sample volume ml
"Gram"	1	10^{2}
Centigram	10^{-2}	1
Milligram	10^{-3}	10^{-1}
Microgram	10^{-5}	10^{-3}

It is equally so on theoretical grounds. More than sufficient molecules are present to ensure that the limit of identification is not passed in qualitative analysis, and to permit an accurate quantitative analysis to be made. Indeed, *Benedetti-Pichler* has calculated[3] that the theoretical limit of identification of a substance is, in general, about 10^{-20} g, while a quantitative analysis could probably be effected on as little as 10^{-16} g with a reasonable degree of certainty. With quantities smaller than these we are approaching too nearly to molecular amounts, and the kinetics of the reactions involved become of the utmost importance. It must be remembered that analytical processes are concerned, in the main, with immediate reactions. The precipitation of silver chloride, as an ionic reaction, is of great value to the analytical chemist. With smaller quantities of material than those indicated, however, it would probably be necessary to treat the precipitation rather on the lines of an organic or molecular reaction such as that between silver nitrate and an alkyl halide. To achieve quantitative precipitation might require, let us guess, boiling for a couple of hours. In such circumstances the usefulness of such a reaction to the analytical chemist might will be considerably reduced.

At the moment, however, I am not so much concerned with the theoretical limits imposed on reactions as with the practical limits. Until recently the usual minimum quantity of interest to the chemist might generally have been assessed as around 10^{-9} g, and this is well within the theoretical limits. But as I have said, this limit has been much extended by recent developments; in this connection I would merely quote two examples. The application of radioactivation techniques to the determination of arsenic allows as little as 10^{-12} g of the element to be readily measured[4]. And recently there has been a note[5] regarding the fascinating test demonstrated by Professor *Philip W. West*, in which 10^{-15} g of copper is detected by rubeanic acid on the human skin. The first of these methods uses a new instrumental procedure, the second

uses an unusual set of conditions. But events have shown that the former procedure can be extended to other elements, and it is not unreasonable to believe that other matrices, just as novel as the human skin, may be found capable of sensitising other already highly sensitive reactions.

In the light of developments of this kind I would stress that although at first I was tempted to use the more precise term "Microgram Analysis" in my title, I was urged by the possibilities which can even today be glimpsed, to use the much wider and more embracing term "Ultramicroanalysis", and to refuse to contemplate further the barrier of a lower limit other than that set by theoretical considerations. The chemist of the small-scale still has a long way to go!

It is now necessary to say something regarding the upper limit, and in doing so to refer once more to the historical development of microchemistry. Reference back to Table II will show that there is a factor of 100 between the gram and centigram scales, a factor of 10 between the centigram and milligram scales, and once more a factor of 100 between the milligram and microgram scales. I am convinced, and I hope to show, that this is significant in several respects. For the moment I would just remind you that historically speaking centigram analysis developed from milligram analysis, and that while similar techniques suffice for both of these, there are radical differences between the techniques of these two ranges and those of the classical range which they were devised to supplement. The factor of 100 between the milligram and microgram ranges calls for exactly the same revision of techniques. *Benedetti-Pichler* has drawn attention to the matter clearly, and has pointed to the reasons for it[6]. He says, "Difficulties arise from the fact that it is impossible to reduce simultaneously in a like proportion volume, surface and linear dimensions of a system. The consequence may become noticeable in all branches of microanalysis." This has its logical development in the use of novel methods of filtration, for example, when one transfers from the gram to the milligram range. For the same fundamental reasons, new methods of handling, transference and the like must be devised when one changes from the milligram to the microgram range.

The effects of the reduction in scale may be roughly classified as direct and indirect, and may best be illustrated by two examples. A direct effect of the reduction is the rapid evaporation of the extremely minute drops of liquid employed, if exposed to the ordinary atmosphere; as a consequence, it is necessary to work throughout in a controlled humidity. An indirect effect arises from the sharp increase of surface tension forces when working with extremely fine pipettes; if the tip of a pipette is fine enough to be used in some of the operations, the effect of surface tension may be so great that it is impossible to expel the liquid from the pipette

using any reasonable pressure, and some means of negativing the surface tension effects, as, for example, by coating the pipette with a non-wetting surface, may have to be employed.

I said earlier that I was going to allow personal preference to restrict severely the field of ultramicro techniques which I proposed to discuss. In spite of the extension of definition which I have already made, I am going to concern myself here primarily with the techniques which the average chemist would consider as qualitative, titrimetric and gravimetric ultramicro procedures. On the whole I will not concern myself with instrumental procedures which deal with amounts of the same order. Nor will I discuss at any length the qualitative methods devised by *Feigl* and now universally recognised under the comprehensive title of spot tests. These, in many cases, are just as sensitive as the methods conventionally classified as ultramicro, and I must be forgiven if I use my time limit as the excuse for dismissing that branch of analysis somewhat cavalierly, since I feel that I should deal with operations which are less universally familiar. I would not have it thought, however, that I regard spot tests as anything other than an important part of qualitative ultramicroanalysis.

Having, thus sketchily, considered the scope of ultramicroanalysis, I must now turn to its development. I think it is quite fair to give credit to *Emich* and *Donau* as pioneers, since they[7] developed the microscopic fibre tests which had a limit of identification of the order of 10^{-10} g. Other individual contributions in earlier days could also undoubtedly be quoted. But real pioneering work, and, indeed, the first organised attack on what is more generally regarded as true qualitative ultramicroanalysis, was carried out by *Benedetti-Pichler* and his co-workers. By developing these techniques, for example for the analysis of pigments used to decorate Chinese oracle bones, such small amounts of material were used that even microscopic examination of the specimens showed no evidence that analysis had been carried out[8]. From this point *Benedetti-Pichler*, who was really the first worker to realise the general applicability of such methods, went on to describe general working techniques for the qualitative analysis of solid samples within the microgram range[9].

These techniques involved reactions and general chemical manipulation of solutions in capillary cones of 0.5 μl capacity, and observation by means of a low power microscope of the actual operations. The reagents and most of the apparatus were assembled on a small glass slide placed in a "moist" chamber to prevent evaporation of the small volumes of solution used. Methods of centrifuging, heating, saturation with gas and the like were evolved. Transfer of solutions was achieved by capillary pipettes controlled by a screw syringe. Working processes

were described for the qualitative analysis of 0.01 μl of a solution containing from one-tenth to one-hundredth of a microgram or even less of various cations, and the procedures were then adapted to permit a semi-quantitative estimate of the amount of each cation present[10].

On the titrimetric side one of the earliest useful techniques which falls well within the ultramicro range was that developed by *Wigglesworth*[11] who, working on 0.002 ml of fluid, developed a method for the accurate determination of the chloride content of the body fluid of a single insect. The essential features of his technique were the use of waxed capillary burettes, thus *eliminating* the surface tension effect of the liquid and ensuring at the same time the total transfer of the liquid; and capillary pipettes with waxed tips which *utilised* capillary effects to enable them to act as constant volume pipettes. Titrations were carried out on a waxed plate, and the drop was stirred by a jet of air which agitated the precipitate in the titration drop.

Ultramicro titration methods have especial value in biochemical work, and full credit must be given to the developments which have been made by biochemists in this particular direction. In particular, those of *Conway* are probably among the best known and most widely used[12]. *Sobel* has given a useful account of the earlier work in this field[13].

Many advances in technique were made by *Kirk* and his co-workers. Their methods have been fully described elsewhere[14], and no extended account of them need to be given here. Thick-walled capillaries are normally used for measuring and delivering liquids. Hypodermic syringes are convenient controls for pipettes. Burettes are usually filled or emptied by a screw plunger device controlling a thread of mercury. Stirring may be carried out by a magnetically vibrated thread stirrer or by a gas stream. Special illumination may be used to show up end-points, which are difficult to detect in the small volumes.

There is no doubt that for a number of years the most accurate quantative determinations in ultramicroanalysis were in titrimetry, since the small volumes of liquid could be very accurately measured and transferred. Many of the titrations which are loosely termed ultramicro must, however, be properly regarded as lying only in the milligram, and not in the microgram range. Examples of true ultramicro procedures are provided by the investigations described by *Loscalzo* and *Benedetti-Pichler*[15].

The development of gravimetric work on the ultramicro range has been slower than that in the other fields mentioned. For accurate gravimetric work the requirements of a balance are that it should have a sensitivity of at least 10^{-8} to 10^{-9} g, and that it should be able to carry a load of at least 100 mg. A balance which could weigh microgram samples in glass or similar vessels with an accuracy in any way approaching that given by either analytical or microchemical balances on the higher

ranges was by no means easy to design. The development of balances of the required sensitivity and robustness has been discussed elsewhere[16]. It was not until the post-war period that such a balance was generally available.

The requirements of atomic energy investigations during the war gave a great impetus to the development of techniques suitable for use in the ultramicro range. It is clear that in the early days at least atomic energy work could only be carried out by the use of such techniques. Thus any of the early papers describing this work contained passages which may be typified by a single quotation: "Furthermore, addition of 0.5 microlitre of the arsenious acid solution in 0.25 molar hydrochloric acid to 1 microlitre of 0.029 molar plutonium-IV solution in molar hydrochloric acid caused precipitation of only a small amount of a yellow-green precipitate . . .[17]". A flow sheet of chemical operations shows the stages working from about 100 kg of a uranium salt right down to 20 micrograms of plutonium, and therefore demanding the whole range of chemical techniques from the largest to the smallest[18]. And most people are familiar with the photographs of early samples of a few micrograms of the synthetic elements neptunium and plutonium.

Although for some years after the war information on these techniques was scanty, sufficient had been released to define certain broad trends for us in Belfast soon after, in 1947, we began serious work in this field. We shortly learned that the methods of *Benedetti-Pichler* and of *Kirk* had been utilised heavily in devising methods to deal with these quantities[19]. The quartz torsion balance principle had been worked out in the torsion-restoration balance. We ourselves had already drawn on *Benedetti-Pichler*'s methods; and his rather complex hydraulic system for the control of liquids had already been abandoned in favour of a micrometer-controlled hypodermic syringe system when it was learned that the same step had been taken by the atomic energy workers. The Salvioni principle in the balance had been tried and found inadequate, and the publication of the detailed description of the *Kirk* balance[20] gave something which it was possible to modify and simplify into a perfectly adequate instrument for gravimetric work.

As far as could be ascertained, no gravimetric work other than simple residue determinations had been carried out, the preference having been for radiometric finishes. One of our principal aims was therefore to examine the possibility of using such a modified balance for ordinary gravimetric work, since we felt that one of the main essentials for the development of such work was that there should be available a reliable balance which should not require too specialised or too rigorous a technique for its use, and which could be constructed at reasonably low cost.

I am glad of this opportunity to acknowledge just how much we feel we owe to the pioneering work of *Benedetti-Pichler* and of *Kirk* and their co-workers, in achieving such success as we have been able to in our investigations.

Our main interests at first were qualitative and semi-quantitative, since we had been stimulated by the fascinating work of *Benedetti-Pichler*. However, we had been thinking along the lines implicit in his remarks where he says "The establishment of the customarily observed statistical equilibria may be expected to take place even when working far below the microgram scale. Thus it seems advantageous to utilise the experience accumulated with thoroughly tested macroprocedures by retaining the customary concentrations on the small scale, and thus ensuring the establishment of the chemical equilibria in the usual manner[6]." As a consequence, we hoped to investigate gravimetric operations in solutions of concentrations comparable to those used in the ordinary range. One of our reasons for this was that we felt that there ought to be reliable gravimetric procedures which could be used as referee methods for microgram procedures utilising other methods such as colorimetric or radiometric finishes.

It is not my intention to describe in detail here the modifications to existing methods which were made, since these have all been described elsewhere[16, 11]. The micromanipulator, which began as a rather unstable and makeshift piece of apparatus, was stabilised and made more convenient in operation. As already stated, the control of the transfer of liquid was by means of a micrometer-operated syringe, a procedure which has, of course, been widely applied since that time in the milligram range. The wax-coated apparatus of *Wigglesworth* was modified, and his principle was ultimately more simply applied by the use of silicone-treated surfaces. The balance construction was very much simplified. It is of much interest to me that the design of the balance has since that time been further simplified and improved from our admittedly *ad hoc* instrument; and the new instrument, described by *T. S. West* at this Symposium[22], should have a very wide appeal.

In qualitative work we have devised modifications of classical procedures for certain of the normal analytical groups. The principal need here has been for ways of coping with operations which cannot merely be scaled down, such as the addition of volatile or of solid reagents. We have found it quite feasible to analyse qualitatively 0.05 μl of solution containing 0.25 to 0.5 μg of sample. We have made a considerable investigation of the proper selection of suitable compact and reproducible precipitates for semi-quantitative work, and on amounts similar to those handled in qualitative analysis we have achieved a mean deviation of less than 10 per cent, and in favourable cases of 5 per cent, which

is at least comparable with absorptiometric and other physical methods on this scale.

On the gravimetric side we have been primarily concerned with "wet" reactions, that is, with ordinary gravimetric procedures scaled down to the microgram range. We have found ways of carrying out such operations as the production, washing, "filtration", drying and weighing of precipitates in glass vessels. Operating with 0.2 μl of solution containing 10 μg of sample, we have obtained deviations in standard gravimetric procedures of less than 1 per cent, which is, of course, better than can be achieved by physical methods in this range, and which therefore satisfies our belief that gravimetric procedures can be used for referee purposes without any hesitation.

It is of interest to note that fears of unusually difficult conditions governing the use of the ultramicro balance have not been realised. The sensitivity of the balance to temperature and vibration is much less than with the normal microchemical balance. Much still remains to be done in this field, both by us and by others, on such problems as the production and handling of precipitates, but we are satisfied that the possibilities in this work have been clearly demonstrated.

I have been asked to consider how I think ultramicro analysis may develop in the near future. I will first of all mention briefly the more obvious lines of development. I have already pointed out that I have been particularly interested in the utilisation of gravimetric methods in the ultramicro range as methods which can supplement or check other procedures which do not always produce recognisable precipitates capable of normal manipulation. There is room for an extensive examination of the multitude of established classical gravimetric procedures, with a view to determining their suitability for use on this scale.

Other applications readily occur to me. The wet chemistry of the new radioelements such as technetium, and of older elements such as protactinium and actinium, which have not previously been available in quantities which could be handled by established procedures, is an obvious one. Problems such as those of corrosion should be more confidently tackled by methods capable of examining the very small amounts of material according to chemical methods derived directly from macroanalysis. And the biologist is undoubtedly much nearer his ultimate ambition, first achieved by *Chambers* and his co-workers[23], of being able to observe directly in every case the chemistry of the single cell, rather than the average behaviour of a multitude of cells. The value of biochemical results, particularly in the range of 10^{-10} to 10^{-11} g will be great.

Carrying this line of thought to the extreme, we can see, as I implied earlier, the possibility of allowing the chemist to make a much closer

approach in practice to the theoretical limit of observing chemical reactions. It will be onerous but fascinating work to push these techniques down to the absolute limit of which they are capable, and indeed *Benedetti-Pichler* has already made some interesting investigations along these lines[24], observing confirmatory reactions at 10^{-13} to 10^{-14} g contained in 10^{-9} to 10^{-11} ml of solution.

I also feel that significant development of physical methods for the detection of end-points in titrations will remove one of the difficulties inherent in titrimetric analysis, enabling true ultramicro titrations to be carried out more easily than at present. On the organic side I anticipate most interesting developments from the application of spot tests of the kind recently described by *Feigl*[25] in which a systematic application of synthetic organic chemistry is able to lead to most convincing identifications. Current trends in the use of physical methods of analysis in the biochemical field have fairly recently been reviewed[26], and in any case I have promised not to consider these in detail.

There are other perhaps less obvious lines of possible development. In organic elementary analysis we have for long been limited in performance by the size of the absorption vessels, the most obvious instance of this being in the determination of carbon and hydrogen. One way of tackling ultramicro organic analysis might be by improving the ultramicro balance so as to allow it to take a bigger load; and some work by *Kuck*[27] has proceeded along these lines. An alternative might be to devise a radically new system of absorbing the combustion products, for, if we examine the procedures, we can see that these are in the main virtually unaltered since they were first introduced by *Pregl*. To go even further, we can see that the basic principles of determining carbon and hydrogen have been virtually unaltered since the time of *Liebig*. It seems to me not impossible that a broad examination of the whole problem might enable a lively mind to devise a fundamentally different method of determining carbon and hydrogen which could be more readily adapted to the ultramicro scale.

My final suggestion regarding the possible development of ultramicro-analysis is one to which I have given much thought, and which seems to me a likely and attractive possibility. I stressed earlier that historically centigram analysis developed after milligram procedures, and that I regarded the relation between these as being especially significant. The step up, by a factor of ten, achieved a popularisation of the milligram procedures which I am sure would never have occurred had they remained on the milligram scale. With a slight increase in sample size, methods were made available which used simple apparatus, which saved time as compared with the classical methods, which used samples considerably smaller than the classical methods, and which were within the capabilities

of the average operator after a relatively short period of training. In other words, practically all the advantages of milligram analysis were retained, since the techniques were still employed, but the particular disadvantages associated with a rigorous application of the techniques were largely eliminated.

I have asked myself repeatedly whether such a shift in scale might not have an equivalent advantage in ultramicroanalysis. Let us assume that the sample size were to be increased to 50 to 100 μg (say 10^{-4} g). This would give a range bearing the same relation to microgram analysis as do centigram techniques to milligram techniques. Using the present type of balance, of course, a higher precision could undoubtedly be achieved, and the robustness of the present balance would admittedly allow this to be done. However, a rather more robust and less sensitive balance could also be utilised. I have in mind either a less sensitive balance constructed according to the principle used in the quartz ultramicro balance: or a balance, perhaps, similar to that recently described by *Graham*[28]: or a modification of that described by *Gorbach*[29]. In any case, the balance should be simple, and so readily constructed that it might be thought of as a general-purpose instrument in any analytical laboratory, just as a semi-micro balance is used by many laboratories that would never expect to make any use of a microbalance. With such a balance and relatively simple apparatus to supplement its use, the average analytical laboratory might be tempted to utilise the methods of ultramicroanalysis more widely, and the average worker ought, without extensive training, to be able to handle the less rigorous technique.

To my mind the widespread expansion of microchemistry (in its widest sense) and the general recognition now accorded to it as a standard part of analytical chemistry are closely related to the shift from milligram to centigram procedures. The same advantage might be expected to arise from a shift from "ultramicro" to "semiultramicro" analysis. The development of deci- or centimilligram procedures might well lead to the same recognition of ultramicroanalysis (again used in the widest possible sense) as a standard part of analytical chemistry, rather than as an esoteric tool to be resorted to on rare occasions, the prerogative of a few laboratories, and practised by masters of technique. It is this single broad line of development which I regard as the most potentially fruitful one for the practice of ultramicroanalysis in the immediate future.

Summary

Ultramicroanalysis can be regarded as dealing with samples of the order of 10^{-5} g or 10^{-3} ml, but this should not be accepted as setting a lower limit, since many procedures are already used whose sensitivity can be utilised well below this range. The development of qualitative

and semi-quantitative inorganic methods, and of titrimetric and gravimetric procedures in the ultramicro range is reviewed, and a number of possible developments are considered. Particularly important is the possibility of an increase in range from 10^{-5} to 10^{-4} g, allowing the same relaxation of rigid techniques which followed the development of "semimicro" from "micro" analysis, and encouraging the more widespread application of ultramicro techniques in the ordinary analytical laboratory.

Zusammenfassung

Ultramikroanalyse kann als ein Verfahren zur Untersuchung von Proben der Größenordnung von 10^{-5} g oder 10^{-3} ml angesehen werden, aber damit soll keine untere Grenze gesetzt werden, zumal viele Methoden bereits angewendet werden, deren Empfindlichkeit weit unter dieses Gebiet reicht. Die Entwicklung qualitativer und halbquantitativer Methoden, maßanalytischer und gravimetrischer Verfahren im Ultramikromaßstab wird im Überblick erörtert und eine Reihe möglicher Entwicklungen in Betracht gezogen. Besonders bedeutungsvoll ist die Möglichkeit einer Erhöhung der Größenordnung von 10^{-5} auf 10^{-4} g, da hierdurch eine ähnliche Erleichterung der schwierigen Arbeitstechnik zu erzielen wäre, wie sie sich beim Übergang von Mikro- zu Halbmikromethoden ergeben hat. Dies würde den Anreiz zu weitgehender Verwendung von Ultramikromethoden in den üblichen Laboratorien bieten.

Résumé

On peut définir l'ultra microanalyse par l'ordre de grandeur des prises d'essais analytiques: soit 10^{-5} g ou 10^{-3} ml; toutefois ces nombres ne peuvent être considérés comme des limites inférieures bien établies car on emploie d'ores-et-déjà de nombreuses techniques dont la sensibilité est bien plus élevée que celle qui correspond à ce domaine. L'auteur passe en revue les méthodes d'analyse minérale qualitative et semi quantitative et les techniques titrimétriques et gravimétriques mises au point à l échelle ultramicroanalytique ainsi qu'un certain nombre de développements possibles. Il met l'accent sur la possibilité de passer du domaine de 10^{-5} g à celui de 10^{-4} g, ce qui permettrait le même relâchement dans la rigueur des techniques que celui qui a suivi la mise au point de la semimicroanalyse à partir de la microanalyse; on encouragerait ainsi l'extension de l'application des ultramicrotechniques dans les laboratoires d'analyses courants.

References

[1] *A. A. Benedetti-Pichler*, Mikrochem. **36/37**, 24 (1951).
[2] *C. L. Wilson*, Mikrochim. Acta [Wien] **1953**, 58.
[3] *A. A. Benedetti-Pichler*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 226 (1940).
[4] *A. P. Seyfang* and *A. A. Smales*, Analyst **78**, 394 (1953).
[5] Chem. Eng. News **32**, 4861 (1954).
[6] *A. A. Benedetti-Pichler*, Mikrochem. **36/37**, 38 (1951).
[7] *F. Emich*, Microchemical Laboratory Manual (transl. by *F. Schneider*). New York: Wiley. 1932.
[8] *A. A. Benedetti-Pichler*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **9**, 149 (1937).
[9] *A. A. Benedetti-Pichler*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **9**, 483 (1937); Introduction to the Microtechniques of Inorganic Analysis. New York: Wiley. 1942.

[10] *A. A. Benedetti-Pichler* and *J. R. Rachele*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 233 (1940); *A. A. Benedetti-Pichler* and *N. Cefola*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 813 (1942); **15**, 227 (1943).

[11] *V. B. Wigglesworth*, Biochemic. J. **31**, 1719 (1937).

[12] *E. J. Conway*, Microdiffusion Analysis and Volumetric Error. 3rd Ed. London: Crosby Lockwood. 1950.

[13] *A. E. Sobel*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **17**, 242 (1945).

[14] *P. L. Kirk*, Quantitative Ultramicroanalysis. New York: Wiley. 1950.

[15] *A. G. Loscalzo* and *A. A. Benedetti-Pichler*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **17**, 187 (1945).

[16] *H. M. El-Badry* and *C. L. Wilson*, Royal Inst. of Chem. Monogr. **4**, 23 (1950).

[17] *B. B. Cunningham* et al., The Transuranic Elements, National Nuclear Energy Series, IV-14B. Vol. I, Paper 3. 2. New York: McGraw Hill. 1949, p. 124.

[18] *B. B. Cunningham* and *L. B. Werner*, The Transuranic Elements, National Nuclear Energy Series, IV-14B. Vol. I, Paper 1. 8. New York: McGraw Hill. 1949, p. 59.

[19] *B. B. Cunningham* and *L. B. Werner*, The Transuranic Elements, National Nuclear Energy Series, IV-14B, Vol. I, Paper 1.8. New York: McGraw Hill. 1949. p. 51. *B. B. Cunningham*, U. S. Atomic Energy Commission, AECD-2703 (1949).

[20] *P. L. Kirk, R. Craig, J. E. Gullberg*, and *R. Q. Boyer*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **19**, 427 (1947).

[21] *T. Brindle* and *C. L. Wilson*, Mikrochem. **39**, 310 (1952). *H. M. El-Badry* and *C. L. Wilson*, Analyst **77**, 526 (1952); Mikrochem. **40**, 141 (1952), 218, 225, 230 (1953).

[22] *H. Asbury, R. Belcher* and *T. S. West*, Mikrochim. Acta [Wien], **1956**, 598.

[23] *R. Chambers, M. J. Kopac* and *C. G. Grand*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **9**, 143 (1937).

[24] *A. A. Benedetti-Pichler* and *J. R. Rachele*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 233 (1940).

[25] *F. Feigl*, Mikrochim. Acta [Wien] **1953**, 157; Birmingham Symposium on Analytical Chemistry, 1954.

[26] *D. Glick*, Chem. Eng. News **31**, 139 (1953).

[27] *J. A. Kuck, P. L. Altieri* and *A. K. Towne*, Mikrochim. Acta [Wien] **1953**, 254; **1954**, 1. *J. A. Kuck* and *P. L. Altieri*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 17. *J. A. Kuck* and *E. C. Grim*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 201. *J. A. Kuck, M. Daugherty* and *D. K. Batdorf*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 297.

[28] *I. Graham*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 746.

[29] *G. Gorbach*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 352.

Versuche über mikrochemische und mikrophysikalische Prüfungsmöglichkeiten an medizinisch wichtigen Pyridin-Derivaten

Von

F. Lüdy-Tenger, Burgdorf, Schweiz

Mit 6 Abbildungen

(Eingelangt am 16. März 1955)

Gelegentlich des 1. Internationalen Mikrochemischen Kongresses in Graz im Jahre 1950 versuchte ich zu zeigen, daß mikrochemische und mikrophysikalische Methoden auch im *Laboratorium des praktizierenden Apothekers* oft sehr dienlich sein können[1]. Als letzte Illustration meiner Ausführungen zeigte ich ein farbiges Diapositiv, das Bild einer damals noch unveröffentlichten Kristallfällung, die entsteht, wenn mein Reagens „Bi I", ein Wismut-Jodkalium-Komplex, mit Nicotylamid zusammenkommt.

In den seither vergangenen Jahren habe ich mich eingehender mit den medizinisch interessanten *Pyridin-Derivaten* befaßt und die Resultate in verschiedenen Zeitschriften veröffentlicht[2–4].

Im folgenden möchte ich eine Zusammenfassung, ergänzt durch noch unveröffentlichte Resultate, geben.

Es erwies sich, daß sich eine ganze Anzahl medizinisch verwendeter Pyridin-Derivate auf denkbar einfache Weise mikrochemisch unterscheiden, ja sogar identifizieren läßt; mehr noch, daß man mit einem Tröpfchen Nicäthamidum (Phantasiename für Coramin) eine *quantitative Bestimmung* dieses sehr viel verwendeten Medikamentes durchführen kann. Ich fand, daß das ursprüngliche Reagens „Bi I" einen etwas verstärkten Salzsäuregehalt aufweisen müsse, um ganz zuverlässige Identitätsreaktionen zu geben. Dieses verstärkte Reagens wurde bezeichnet mit „Bi I 1,5", womit ein Hinweis auf den Salzsäuregehalt gegeben werden soll. Dieses Reagens ist eine der vielen Modifikationen des Dragendorff-Reagens. Es hat die Zusammensetzung:

Rp. Bismuti subcarbonici 0,5
Acidi hydrochlorici conc. 1,5
Kalii iodati 4,0
Aquae destillatae ad 10,0 ml.

Dieses Reagens kann in jeder Apotheke rasch und mühelos sofort bereitet werden. Mit einem Tropfen dieser Lösung können eindeutig identifiziert werden:

1. Nicotylamid,
2. Nicotinsäure,
3. Isonicotinsäure,
4. Isonicotinsäure-Hydrazid (Rimifon),
5. Nicotinsäure-Hydrazid.

Schon die Mikrosublimate dieser fünf Körper unterscheiden sich wesentlich voneinander, wie die Mikrophotographien in unsern erwähnten Teilpublikationen zeigen. Wir erwähnen dies allerdings nur der Vollständigkeit wegen, denn niemand wird bloß aus Kristallformen von Sublimaten schon Schlüsse ziehen. Die Mikrosublimate zeigen folgende Characteristica, wobei eine 5-mm-Ring-Gaskammer auf unserm „T. B. Block" verwendet wird[3]:

1. Nicotylamid:	Blocktemperatur ca. 120°. Rhomben mit Winkeln von 80° und 100°; gerade Löschung.
2. Nicotinsäure:	Blocktemperatur ca. 160°. Scharfkantige, kurze, derbe Rechtecke; gerade Löschung.
3. Isonicotinsäure:	Blocktemperatur ca. 180°. Derbe, kurze, schiefgeschnittene Prismen, oft Fünfecke; Löschung unbestimmt, an länglichen Kristallen gerade.
4. Isonicotinsäure-Hydrazid (Rimifon):	Blocktemperatur ca. 150 bis 160°. Längliche Prismen mit stumpfwinkligen Enden; gerade Löschung.
5. Nicotinsäure-Hydrazid:	Blocktemperatur ca. 150 bis 160°. Flächige Blättchen, stellenweise Nadeln; gerade Löschung (Abb. 1.)

Von den erwähnten Substanzen sind als Arzneimittel in Tablettenform im Handel Nicotylamid (Vi-Nicotyl „Wander"), Nicotinsäure (Niconacid „Wander") und Isonicotinsäure-Hydrazid (Rimifon „Roche"). Um eine Identitätsreaktion mit „Bi I 1,5" durchzuführen, versetzt man auf einem

Objektträger ganz wenig vorsichtig abgekratzte Tablettenmasse mit einem kleinen Tropfen „Bi I 1,5", dann bedeckt man mit einem Bruchstück eines Deckglases. Nach einigen Minuten treten die charakteristischen Kristallbildungen auf. Dabei stören die Tablettierzusätze nicht. Man kann die abgeschabte Tablettenmasse natürlich mit Vorteil auch durch Mikrosublimation vorreinigen. Reinsubstanz von „Rimifon" gewinnt man elegant, indem man 1 Tablette mit Methanol tränkt, hierauf mit Chloroform auszieht und filtriert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels hinterbleibt Isonicotinsäure-Hydrazid analysenrein, mit Fp = 166,5 bis 167°.

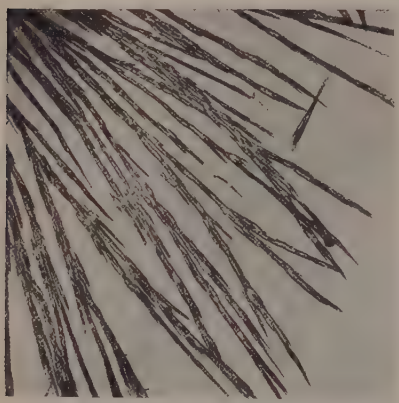


Abb. 1. Sublimat von Nicotinsäure-Hydrazid
Blocktemperatur 150 bis 155°
Flächige Blättchen, oft Nadeln
Löschung gerade

Die erwähnten Pyridin-Derivate reagieren mit „Bi I 1,5" meist so, daß zuerst rote Tropfen entstehen, die dann bald in ganz charakteristischen Formen kristallin werden. Anwendung von Wärme ist unnötig. Auch hier begnügt man sich nicht, Kristallformen festzustellen. Man muß die Reaktionsprodukte wenn möglich noch näher untersuchen, am einfachsten auf ihre Löschung im polarisierten Licht hin[5].

Mit „Bi I 1,5" entstehen aus:

1. *Nicotylamid:* Fp = 126 bis 128°. — Rotleuchtende Nadeln und schiefgeschnittene Prismen, auch Sphärokristalle. Selten rote, sechseckige Tafeln mit Spitzenwinkel von 101°, anliegende Winkel 127 und 132°. *Löschung immer gerade.*

2. *Nicotinsäure:* Fp = 228 bis 229°. — Rotleuchtende, *kurze*, derbe und scharfkantige Rhomben. Stumpfer Winkel von 129°. *Löschung schief*, im Mittel 33° zur Längsrichtung.

3. *Isonicotinsäure:* Fp = 298 bis 300° (im zugeschmolzenen Kapillarrohr bestimmt). — Rotleuchtende, *längliche*, scharfkantige Rhomben. Stumpfer Winkel (wie bei Nicotinsäure) von 129°. *Löschung schief*, im Mittel 36° zur Längsrichtung.

4. Isonicotinsäure-Hydrazid: Fp = 166,5 bis 167° (Rimifon). Rotleuchtende, wetzsteinförmige Kristalle, die zu derben Agglomeraten auswachsen. Nicht sehr befriedigende Reaktion, immerhin von andern Fällungen unterscheidbar.

5. Nicotinsäure-Hydrazid: Fp = 157 bis 158°. Rotleuchtende, sehr derbe, rechtwinklige, kurze Prismen. Löschung gerade. Daneben vereinzelte Rhomben mit schiefer Löschung von 33°, die auf Verunreinigung mit Nicotinsäure deuten oder von abgespaltener Nicotinsäure herrühren können (Abb. 2).

Da die soeben erwähnte Fällung des Rimifons wenig befriedigende Kristallformen zeigt, suchte ich nach einer präziseren mikrochemischen Charakterisierung dieses Arzneistoffes. Mit Vorteil bedient man sich der bekannten Reaktion, die eintritt zwischen Aldehyden und Ketonen und der endständigen NH_2-Gruppe der Hydrazide. Benzaldehyd erwies sich als sehr geeignet nicht nur deswegen, weil er in jeder Offizin zur Verfügung steht, sondern weil er so rasch mit Rimifon reagiert, daß diese Kristallbildung photographisch kaum festgehalten werden kann. Der entstehende Körper, das *Benzalisonicotinsäure-Hydrazid,* von der Formel $NC_5H_4 \cdot CO \cdot NH \cdot N{:}\ CH \cdot C_6H_5$ ist, wie die Rimifonsubstanz selbst ja auch schon längst bekannt. Beide Körper wurden bereits 1912 beschrieben[6].

Abb. 2. Nicotinsäure-Hydrazid mit „Bi I 1,5" Rotleuchtende, derbe, rechtwinklig, kurze Prismen Löschung gerade

Meyer und *Mally* geben für Isonicotinsäure-Hydrazid einen Fp = 163° an, während wir immer wieder 166 bis 167° finden. Vom Benzalisonicotinsäure-Hydrazid geben die erwähnten Autoren keinen Schmelzpunkt an. Wir bestimmten ihn mit 191 bis 191,5° (unkorr.).

Auch ein Reaktionsprodukt des Rimifons mit Vanillin, das 3-Methoxy-4-hydroxybenzalisonicotinsäure-Hydrazid wird bereits von *Meyer* und *Mally* erwähnt.

Ich habe eine ganze Reihe Aldehyde und Ketone mit Rimifon

geprüft und die Reaktionsprodukte auf Schmelzpunkt und Löschung sowie auf Kristallformen untersucht[3].

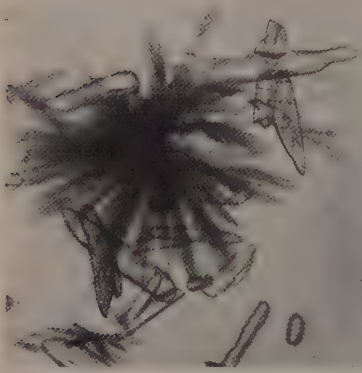


Abb. 3. Benzalisonicotinsäure-Hydrazid
Fp = 191 bis 191,5°, Nadeln
Löschung gerade

Abb. 4. 3-Methoxy-4-oxybenzalisonicotinsäure-Hydrazid
Fp = 222,5° bis 224, gelbliche, schiefgeschnittene Nadeln und Prismen
Löschung gerade

Für die Bedürfnisse des praktizierenden Apothekers genügen die Reaktionen mit Benzaldehyd und mit Vanillin vollkommen.

Diese Reaktionen führen wir aus wie folgt:

Einige Kriställchen eines festen Aldehydes werden in einem Meßgläschen (wie solche den pharm. Spezialitäten oft beigepackt sind) in einigen Tropfen Äthanol gelöst. Flüssige Aldehyde gibt man ohne Äthanol ins Meßgläschen. Hierauf fügt man ca. 1 ml einer ca. 10%igen wäßrigen Rimifonlösung zu und schüttelt energisch. Das Reaktionsprodukt kristallisiert bald. Es wird auf einem Papierfilterchen oder auf einer kleinen Glasnutsche „G 1" gesammelt. Man kristallisiert um durch Lösen in wenig Äthanol und Zugabe von wenig Wasser zum klaren Filtrat.

Rimifonlösung gibt auf diese Weise:

1. Mit *Benzaldehyd:*
   Benzalisonicotinsäure-Hydrazid. Nadeln mit gerader Löschung. Fp = 191 bis 191,5° (Abb. 3).
2. Mit *Vanillin:*
   3-Methoxy-4-hydroxybenzalisonicotinsäure-Hydrazid. Gelbliche, schiefgeschnittene Prismen und Nadeln mit gerader Löschung. Fp = 222,5 bis 224° (Abb. 4).

Erst in letzter Zeit befaßte ich mich auch mit dem *Nicotinsäure*-Hydrazid, das, soviel mir bekannt ist, vorläufig noch nicht medizinisches Interesse hat, jedoch Verwechslungen mit dem Isonicotinsäure-Hydrazid veranlassen könnte. Bei Bearbeitung neuer Arzneibücher wird daher auch dieser Körper studiert. Ich habe bereits erwähnt, daß man

beide Körper leicht schon mit 1 Tropfen „Bi I 1,5" unterscheiden kann, da die Reaktionsprodukte nicht zu verwechseln sind. Es blieb nun noch zu prüfen, wie sich *Nicotin*säure-Hydrazid den verschiedenen Aldehyden gegenüber verhält. Zur Gegenüberstellung der soeben erwähnten Rimifon-Reaktionen mit Benzaldehyd einerseits, Vanillin andererseits, seien hier vorläufig die gleichen Reaktionen mit Nicotinsäure-Hydrazid vorweggenommen. Auch hier verwenden wir eine ca. 10%ige wäßrige Lösung.

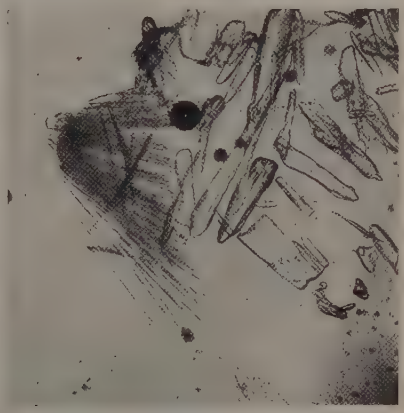


Abb. 5. Benzalnicotinsäure-Hydrazid
Fp = 146,5 bis 148°, farblose Nadeln und Prismen
Löschung gerade

Nicotinsäure-Hydrazid-Lösung gibt:

1. Mit *Benzaldehyd:*

   Benzalnicotinsäure - Hydrazid. Weißer Niederschlag aus Nadeln und Prismen. Gerade Löschung. Bei der Schmelzpunktsbestimmung entsteht um 90° herum eine teilweise Schmelze, aus der neue Prismen hervorwachsen. Fp = 146,5 bis 148° (Abb. 5).

2. Mit *Vanillin:*

   3 - Methoxy - 4 - hydroxybenzalnicotinsäure-Hydrazid. Kristalliner, gelblicher Niederschlag, aus Äthanol in Tafeln und Rhomben, aus verdünntem Äthanol in Nadelbüscheln kristallisierend.
   Löschung: Gerade.
   Bei der Schmelzpunktsbestimmung bildet sich langsam, zwischen ca. 102 und 108°, eine ölige Masse, die bei ca. 150° wieder in derben Prismen kristallisiert, worauf der Schmelzpunkt Fp = 203 bis 205° gefunden wird (Abb. 6).

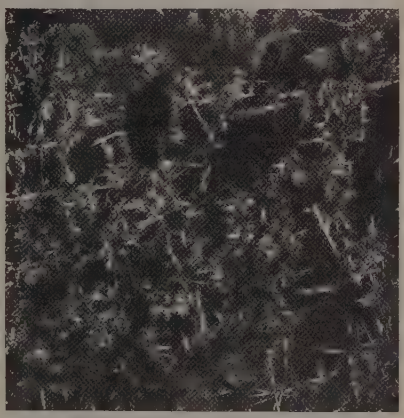


Abb. 6. 3-Methoxy-4-hydroxybenzalnicotinsäure-Hydrazid
Fp = 203 bis 205°
Gelbliche Nadelbüschel
Löschung gerade

Diese Mikrobeobachtung bestätigte sich im Makroversuch: Es wurde in einem Reagensglas eine kleine Menge der gelben Vanillin-Nicotinsäure-

hydrazid-Verbindung erhitzt, die Temperaturen mit eingestecktem Thermometer kontrolliert. Um 100 bis 105° wurde die Schmelze gelb, dann wieder fest. Bei 195 bis ca. 200° entstand eine dunkelgelbe Schmelze. Nach deren Erkalten wurde sie in heißem, konz. Äthanol gelöst. Aus dem klaren, gelben Filtrat schieden sich tafelförmige, gelbe Kristalle ab. Bei der Bestimmung des Schmelzpunktes dieser gelben Substanz wiederholten sich die Vorgänge, wie oben beschrieben. Man erhielt den Wert Fp = 204 bis 207°. Aus diesem Versuch, scheint mir, ergibt sich, daß diese sonderbaren Zwischen-Halbschmelzen als „Modifikationen", sicher nicht als Zersetzungen zu deuten sind. Vielleicht auch treten Umlagerungen ein, die Verbindung als solche bleibt aber bestehen und kann aus der Schmelze mit Äthanol und Wasser wieder in die ursprüngliche Form gebracht werden.

Die Reaktionsprodukte verschiedener Aldehyde mit Rimifon einerseits, mit Nicotinsäure-Hydrazid andererseits, sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Aldehyd	Reaktionsprodukte mit wäßrigen 10%igen Lösungen von	
	Isonicotinsäure-Hydrazid (Rimifon)	Nicotinsäure-Hydrazid
Benzaldehyd (flüssig).	Nadeln. Gerade Löschung. Fp = 191 bis 191,5°.	Nadeln und Prismen. Gerade Löschung. Um 90° teilweise Schmelze, worauf sich neue Prismen bilden. Fp = 144 bis 146°.
o-Nitrobenzaldehyd Fp = 42,5 bis 43,5°.	Fiedrige Kristalle. Schiefe Löschung (17°). Fp = 224 bis 226°.	Nadelbüschel. Gerade Löschung. Um 110° Umlagerung. Fp = 185 bis 187°.
m-Nitrobenzaldehyd Fp = 55,5 bis 57°.	Rhombische Blättchen. Gerade Löschung. Fp = 219 bis 221°.	Kleine Nadelbüschel. Gerade Löschung. Um 105° Umlagerung, teilweise Tropfenbildung, aus denen neue Nadelbüschel wachsen. Fp = 175 bis 177°.
p-Nitrobenzaldehyd Fp = 105,5°.	Gelbe Prismen. Bei ca. 260° Sublimat von derben Prismen. Löschung schief (im Mittel 57°). Fp = 267 bis 268°.	Gelbe, ganz kleine Nadeln. Löschung schief, im Mittel 31°, Sublimat löscht gerade. Fp = 250 bis 251°.
m-Hydroxybenzaldehyd Fp = 104°.	Sphärokristalle, sehr kleine Nädelchen. Gerade Löschung. Fp = 254 bis 255°.	Kleine Nädelchen. Gerade Löschung. Fp = 216 bis 219°.

(Fortsetzung) Tabelle 1

Aldehyd	Reaktionsprodukte mit wäßrigen 10%igen Lösungen von	
	Isonicotinsäure-Hydrazid (Rimifon)	Nicotinsäure-Hydrazid
p-Hydroxybenzaldehyd Fp = 115 bis 118°.	Feine Nadeln. Gerade Löschung. Fp = 287 bis 288° (Zersetzung).	Nadeln. Gerade Löschung. Bei 110° bis 125° teilweise flüssig, dann wieder Nadeln. Fp = 234 bis 236,5°.
2,4-Dihydroxybenzaldehyd Fp = 133 bis 134°.	Gelbe Nadeln. Gerade Löschung. Fp unscharf um 280°, unter Zersetzung, roter Teer.	Kleine, gelbe Nädelchen. Gerade Löschung. Fp = 269° (Zersetzung).
Protocatechualdehyd (3,4-Dihydroxybenzaldehyd) Fp = 150 bis 151°.	Gelbe Prismen. Gerade Löschung. Fp = 259 bis 261,5°.	Nadeln. Gerade Löschung. Um 135° teilweise flüssig, dann Bildung kurzer Nadeln in Büscheln. Fp = 234 bis 235° (Zersetzung).
p-Dimethylaminobenzaldehyd Fp = 72 bis 73°.	Nadeln und gelbliche Sechsecke. Gerade Löschung. Fp = 68 bis 70,5°.	Sechseckige Tafeln, Nadeln. Gerade Löschung. Um 55° teilweise Schmelze, dann wieder fest. Fp = 69 bis 71°.
2-Naphthylaldehyd Fp = 52 bis 57°.	Lange Nadeln, mit gerader, hie und da schiefer Löschung (35°). Um 115° teilweise Schmelze, dann alles fest. Fp = 169 bis 170°.	Schöne Nadeln. Gerade Löschung. Um 105° bis 115° teilweise Schmelze, dann fest, in groben Drusen. Fp = 165 bis 166°.
Piperonal Fp = 36°.	Ungleiche Blättchen. Gerade Löschung an länglichen Kristallen. Von 50° bis 130° teilweise Schmelze, woraus grobe, stark lichtbrechende Prismen kristallisieren; diese löschen gerade. Fp = 224 bis 225°.	Derbe, kurze, rechteckige Prismen. Gerade Löschung. Von 105° bis 150° teilweise Schmelze, aus welcher neue Prismen in Büscheln wachsen. Fp = 192 bis 193°.

Nachdem ich erkannt hatte, daß sich mit 1 Tropfen „Bi I 1,5" die Nicotinsäure sehr leicht mikrochemisch nachweisen läßt, beschäftigte mich natürlich sofort die Frage, ob die Nicotinsäure in dem bekannten Medi-

(Fortsetzung) Tabelle 1.

Aldehyd	Reaktionsprodukte mit wäßrigen 10%igen Lösungen von	
	Isonicotinsäure-Hydrazid (Rimifon)	Nicotinsäure-Hydrazid
Vanillin Fp = 80 bis 81°.	Gelbliche, schiefgeschnittene Prismen und Nadeln. Gerade Löschung. Fp = 222,5 bis 224°.	Gelbe Kristalle, aus Äthanol in Tafeln und Rhomben, aus verdünntem Äthanol in Nadelbüscheln kristallisierend. Gerade Löschung. Zwischen 102° und 108° ölig, aus der Halbschmelze kristallisieren bei 150° derbe Prismen. Fp = 203 bis 205°.
Äthyl-Vanillin Fp = 73 bis 75°.	Agglomerat feiner Fäden, das bei 255° ein Sublimat derber, schiefgeschnittener Prismen gibt. Gerade Löschung. Fp = 245°.	Feine Nadelbüschel. Gerade Löschung. Zwischen 50° und 120° teilweise Schmelze, aus der Sphärokristalle wachsen. Fp = 180 bis 181°.
Formaldehyd (offizinelle Lösung).	Erst nach langem Stehen Sphärokristalle.	Erst nach langem Stehen Prismen. Gerade Löschung. Fp = 143 bis 146°.
Salicylaldehyd (flüssig).	Nadeln. Schiefe Löschung (47°). Fp = 237 bis 239°.	Gelbe, feine Nadelbüschel. Gerade Löschung. Bei 90° teilweise geschmolzen, worauf Drusen entstehen. Fp = 179 bis 179,5°.
Zimtaldehyd (flüssig).	Nadeln und Prismen. Schiefe Löschung, meist 51° oder 47°. Fp = 192 bis 193°.	Breite Blättchen, Nadeln. Gerade Löschung an länglichen Kristallen. Bei 85° bis 95° teilweise Schmelze, daraus Sphärokristalle. Fp = 157 bis 157,5°.

kament „Coramin" nicht auch nachgewiesen werden könne. Alle Versuche schlugen zuerst fehl. Erst als ich im Chloroform ein geeignetes Waschmittel gefunden hatte, um das beim Abbau gebildete salzsaure Diäthylamin zu entfernen, gelang der mikrochemische Nachweis mit „Bi I 1,5". Dieser wurde seinerzeit veröffentlicht[2], wobei noch 15 Tropfen der üblichen 25%igen Lösung benötigt wurden. Heute gelingt dieser Nachweis mit *einem einzigen Tropfen Coraminlösung.*

Das Prinzip meiner Nachweismethode ist einfach: Die wäßrige, saure Nicäthamidlösung (Phantasiename für Coramin) wird alkalisch gemacht. Das Nicotinsäure-Diäthylamid scheidet sich ölig ab. Es wird durch Er-

hitzen mit konz. Salzsäure bis auf 210° in salzsaures Diäthylamin und in das Nicotinsäure-Chlorhydrat gespalten. Ersteres wird mit Chloroform weggewaschen, aus dem Rückstand gewinnt man ein Mikrosublimat von Nicotinsäure, das mit „Bi I 1,5" die typischen Rhomben entstehen läßt. Auch entsteht genügend Sublimat, um die Nicotinsäure auf ihren Schmelzpunkt zu prüfen. Da hierbei die Nicotinsäure sehr leicht verdunstet, bevor sie schmilzt, haben wir früher die Substanz im beidseitig zugeschmolzenen Rohr untersucht. Von einem einzigen Tropfen Coraminlösung erhält man aber so wenig gereinigtes Sublimat, daß der Fp auf dem Deckglas selbst bestimmt werden muß. Wir behelfen uns, indem wir das runde Deckglas mit einem Stück Heftpflaster auf den Objektträger kleben, Sublimat nach innen. In das Heftpflaster wird mit einem Korkbohrer vorher ein Beobachtungsloch geschnitten. Auf diese Weise gelang es, die Nicotinsäure mit ihrem Fp = 228° zu charakterisieren. Der „Abbau" ist aus unserm Schema leicht zu übersehen:

1 gtt Coramin + 2 gtts KOH sol. + 1 ml Äther. Schütteln. Schichten trennen. Mit Mikropipette ätherische Lösung wegnehmen. Im Eder-Mikrosublimierapparat auf „T. B. Block" vom Äther befreien. 5 gtts konz. HCl dazu. Erhitzen bis Blocktemperatur 210°. Erkalten. Mehrere Male Rückstand mit Chloroform behandeln. Mikrosublimate auf runde Deckgläser bei Blocktemperatur bis ca. 225°. Sublimate nochmals mit Chloroform abwaschen. Nachweis durch Fp-Bestimmung, mit weiterem Sublimat mit „Bi I 1,5".

Längere Zeit beschäftigte ich mich mit der Frage des *Brechungsexponenten*. Da im Apothekenlaboratorium Naturprodukte zu prüfen sind, genügt die Bestimmung des Index auf 3 Dezimalstellen vollauf. Bei den in Frage kommenden Naturstoffen, wie ätherischen und fetten Ölen, Glycerin u. a. m., müssen so weite Extremwerte des Index zugelassen werden, daß es gar keinen Sinn hätte, diesen bis auf 4 oder gar bis auf 5 Dezimalen zu bestimmen. Die kostspieligen, optischen Bestimmungsapparate kommen daher für das Pharmazielaboratorium von vornherein gar nicht in Frage.

Zuerst versuchte ich das Problem mit *Koflers Glaspulver-Skala* zu lösen. Ich setze die Methode als bekannt voraus. Man sucht die Temperatur, bei der die Richtung der Wanderung der *Becke*schen Linie umkehrt und hat dann, auf 4 Dezimalen genau den Brechungsexponenten. Da wir nur auf 3 Dezimalen genaue Werte brauchen, genügt es demnach, *ohne Heizblock* einfach diejenigen Glaspulversorten zu finden, *zwischen* denen die Umkehrung der Wanderrichtung der *Becke*schen Linie stattfindet[4]. Man kann mit *Kofler*s Pulverserie *ohne Heizquelle* entscheiden, ob ein ätherisches Öl den Anforderungen des Arzneibuches genügt oder nicht. Auch die Temperatur der zu prüfenden Substanz spielt bekanntlich eine Rolle. Nach älteren Untersuchungen von *Brühl*, die 1952 nachgeprüft und als richtig befunden wurden[7], beträgt der mittlere Koeffizient für alle Lichtarten 0,00045 Einheiten pro 1° Temperaturdifferenz. Wir haben mit *Kofler*s Glaspulvern denselben Wert gefunden, indem wir die

Glaspulver auf unserm „T. B. Block" verwendeten, einmal mit Glycerin, das andere Mal mit konz. Nicäthamid. Bei beiden Kurven ist die Temperatur auf der Abszisse, der Index auf der Ordinate aufgetragen[4]. Aus den entstehenden Kurven (Umkehr der Wanderrichtung der *Becke*schen Linie) ergibt sich durch Berechnung, daß die *Brühl*sche Zahl genau stimmt. Es zeigte sich aber auch, daß die Temperatur keinen wesentlichen Einfluß

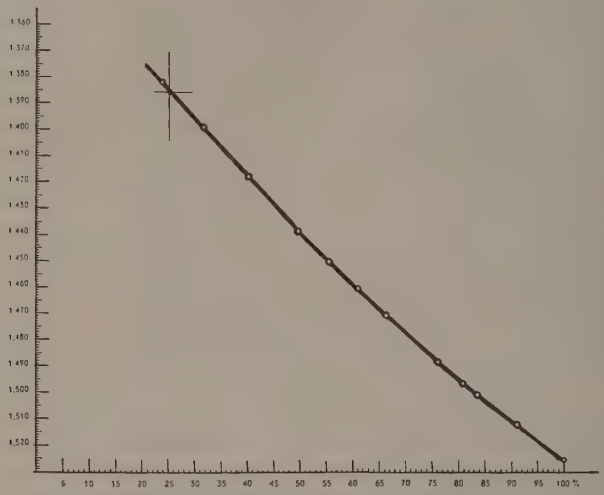


Abb. 7. Beziehungen zwischen Brechungsexponent und Konzentration von Nicaethamidum

hat, wenn nur auf 3 Dezimalen genau bestimmt werden kann, wie das bei Naturprodukten der Fall ist.

Gerade in dem Augenblick, wo die Redaktionskommissionen der Arzneibücher verschiedenster Länder sich entscheiden müssen, auf welche Weise sie mit dem Problem „Brechungsexponent" fertig werden wollen, brachte die Firma E. Leitz GmbH. in Wetzlar das *Mikrorefraktometer nach Jelley* heraus. Der Strahlengang des genial-einfachen Gerätes ist aus der von der Firma herausgegebenen Zeichnung ohne Mühe verständlich[4]. Ich selber benütze das Gerät seit zwei Jahren zur Prüfung der Wareneingänge und könnte es nicht mehr missen. Der Index ergibt sich sicher auf 2 Dezimalen, durch Schätzung auf drei. Immerhin sähe ich eine mögliche Verbesserung des Gerätes, wenn die eine Hälfte der Skala noch weiter unterteilt würde. Wer aber einigermaßen „Augenmaß" besitzt, bestimmt die dritte Dezimale mühelos. Mit diesem Apparat prüften wir u. a. Glycerin verschiedenster Konzentration, wobei auf einer gewöhnlichen Analysenwaage gewogen wurde, und zwar verschiedene

Tropfenmengen Glycerin und Wasser. Die resultierende Kurve ergab[4], daß sich die von uns bestimmten Zahlen gut einfügen in Angaben, die *Kadmer*[8] gemacht hatte.

Analog prüfte ich das käufliche 100%ige Nicäthamid und dessen Verdünnungen und trug die Resultate zu einer Kurve zusammen, die nun umgekehrt *als Meßkurve*[4] dienen kann, um mit einem ganz kleinen Tropfen *quantitativ zu bestimmen*, ob das Präparat, das so weitverbreitet ist, wirklich auch die verlangte Konzentration von 25% besitze.

Es sollte aus diesen Beispielen ersichtlich sein, mit welchem praktischen Wert sich kommende Arzneibücher der mikrochemischen und mikrophysikalischen Methoden bedienen könnten.

Meinem verehrten Lehrer und Freund, Herrn Prof. *L. Rosenthaler*, Bern, möchte ich auch an dieser Stelle für seine wertvollen Ratschläge danken.

Zusammenfassung

Wirklich neuzeitliche Arzneibücher sollten in vermehrtem Maße mikrochemische und mikrophysikalische Methoden verwenden, sei es zur Identifizierung von Arzneistoffen, sei es selbst zu quantitativen Prüfungen.

Am Beispiel medizinisch viel verwendeter Derivate des Pyridins wird gezeigt, daß mit geringsten Mengen abgeschabter Tablettenmassen mit 1 Tröpfchen „Bi I 1,5 Lüdy", einem modifizierten Dragendorff-Reagens, mühelos unterschieden werden können:

1. Nicotylamid,
2. Nicotinsäure,
3. Isonicotinsäure,
4. Isonicotinsäure-Hydrazid (Rimifon),
5. Nicotinsäure-Hydrazid (als Verunreinigung oder Verwechslung von 4.).

Da Rimifon mit „Bi I 1,5 Lüdy" eine nicht ganz befriedigende Fällungsreaktion gibt, die immerhin zur Differenzierung genügen würde, wurde versucht, die Reaktion von Aldehyden und Ketonen mit der endständigen NH_2-Gruppe zu verwenden. Es resultierten Reaktionsprodukte einer ganzen Reihe Aldehyde, von denen praktisch nur Benzaldehyd und Vanillin zur Verwendung vorgeschlagen werden, da beide Substanzen unterscheidbare Reaktionsprodukte liefern und zugleich in jeder Apotheke zur Verfügung stehen.

Die Beschäftigung mit dem Problem „Brechungsexponent" führte wiederum zur Arzneimittelgruppe „Derivate des Pyridins" zurück, indem eine *Meßkurve* zusammengestellt wurde, mit deren Hilfe durch Bestimmung des Index auf nur ^{3} Dezimalstellen genau eine quantitative Be-

stimmung des viel verwendeten Arzneimittels Nicäthamidum (Coramin) möglich ist.

Summary

Derivatives of pyridine that are widely used in medicine were employed to show that the following can be easily distinguished with one drop of "Bi I 1.5 Lüdy", which is a modified Dragendorff reagent. Very slight amounts shaved from tablets suffice. The materials distinguished were: nicotylamide, nicotinic acid, isonicotinic acid, isonicotinic acid hydrazide (Rimifon), nicotinic acid hydrazide (as contaminant of Rimifon).

Since Rimifon does not give a completely satisfactory precipitation reaction with the reagent, at any rate not good enough for differentiation, an attempt was made to apply the reaction of aldehydes and ketones with the terminal NH_2 group. Reaction products were obtained with a whole series of aldehydes. Of these only benzaldehyde and vanillin are suggested since both yield reaction products that are distinguishable and also because both can be obtained in any pharmacy.

Study of the problem of refractive index led once more to the medicinals of the "derivatives of pyridine" type because a calibration curve was assembled and with its help, through determination of the index to only three places, it was possible to arrive at an accurate quantitative determination of the widely used remedy nicaethamidum (coramin).

Résumé

On montre qu'une goutte de «Bi I 1,5 Lüdy» (réactif de Dragendorff modifié) permet de différencier aisément certains dérivés de la pyridine souvent employés en médecine; on utilise à cette fin de très faibles quantités de substances obtenues par grattage de comprimés des produits suivants:

1 — Amide nicotique
2 — Acide nicotique
3 — Acide isonicotique
4 — Hydrazide isonicotique (Rimifon)
5 — Hydrazide nicotique (comme impureté de 4)

Le rimifon ne donnant pas avec le «Bi I 1,5 Lüdy» une précipitation entièrement satisfaisante qui puisse toujours être employée dans les différenciations, on a cherché à utiliser à cette fin la réaction des aldéhydes et des cétones avec le groupe terminal NH_2. On a ainsi préparé les produits de réaction de toute une série d'aldéhydes parmi lesquels seuls le benzaldéhyde et la vanilline sont recommandables pour un emploi pratique. Ces deux substances donnent en effet naissance à des produits de réactions discernables et on les trouve en outre dans toutes les pharmacies.

Le problème de «l'indice de réfraction» conduit de nouveau au groupe de médicaments «dérivés de la pyridine». On peut en effet établir une courbe de correspondance qui permet de doser quantitativement un médicament fort répandu, le diéthylamide nicotique (ou coramine) par simple détermination de l'indice de réfraction avec seulement 3 décimales exactes.

Diskussion

Fr. *M. Brandstätter* (Innsbruck): Ich möchte fragen, ob dem Vortragenden die beiden von *Fischer* verwendeten Pulver bekannt sind, die mit ihrem niederen Brechungsindex die Reihe nach unten fortsetzen: es handelt sich

hierbei um das Natriumfluorid und das Lithiumfluorid. Haben Sie damit Versuche gemacht?

H. *F. Lüdy-Tenger:* Nein, ich habe bloß die käuflichen Pulver verwendet.

Fr. *M. Brandstätter:* Wir stehen nämlich auch vor demselben Problem und haben dann eben versucht, die *Fischer*'schen Pulver anzuwenden. Aber bei unserer Problemstellung war nichts zu machen, da diese Substanzen wasserlöslich sind. Aber für die Untersuchung ätherischer Öle würden sie sich ja wahrscheinlich eignen.

H. *F. Lüdy-Tanger:* Ich war der Meinung, man könnte auch Glaspulver mit Brechungsindexwerten zwischen den üblichen herstellen.

Fr. *M. Brandstätter:* Dies ist ungeheuer schwierig. *Kofler* hat immer wieder versucht, von Schott solche Gläser zu bekommen. Aber es war schon schwierig genug, die Gläser so, wie sie jetzt sind, zusammenzustellen, obwohl die Reihe Lücken aufweist. Möglicherweise könnte man andere Substanzen, nicht Gläser, hierfür verwenden.

H. *F. Lüdy-Tenger:* Das wäre sehr erfreulich. Jedenfalls besteht ein solches Bedürfnis in der praktischen Pharmazie.

Literatur

[1] *F. Lüdy-Tenger*, Mikrochem. **36/37**, 882 (1951).
[2] *F. Lüdy-Tenger*, Mikrochem. **38**, 460 (1951).
[3] *F. Lüdy-Tenger*, Pharmaceut. Acta Helv. **28**, 22 (1953).
[4] *F. Lüdy-Tenger*, Pharmaceut. Acta Helv. **29**, 127 (1954).
[5] *F. Lüdy-Tenger*, Pharmaceut. Acta Helv. **22**, 476 (1947).
[6] *H. Meyer* und *J. Mally*, Mh. Chem. **33**, 401 (1912).
[7] *Roth, Eisenlohr* und *Löwe*, Refraktometrisches Hilfsbuch. Berlin: Gruyter. 1952. S. 95 ff.
[8] *Kadmer*, Fettöle, Wachse, Harze und ihre Verarbeitungsprodukte. Wolfenbüttel: 1948. Zitiert nach *K. Opfer-Schaum*, Mikroanalyse organischer Arzneimittel und Gifte. Aulendorf i. Württ.: Cantor. S. 46.

Service de Contrôle des Médicaments de l'Association Pharmaceutique Belge, Bruxelles

L'utilisation des méthodes microanalytiques dans l'analyse des spécialités pharmaceutiques

Par

Serge Simon

(Reçu le 16 Mars 1955)

Le Corps Pharmaceutique Belge, soucieux de vérifier la conformité des spécialités pharmaceutiques à la formule déclarée, a organisé très tôt leur contrôle et a équipé dans ce but un laboratoire dont la direction scientifique et technique est assurée exclusivement par des Pharmaciens. C'est de là qu'est sorti le Service de Contrôle des Médicaments de l'Association Pharmaceutique Belge. Depuis quelques années, ce laboratoire s'est développé rapidement et a étendu son champ d'investigation à tous les domaines qui touchent de près la nature des médicaments: chimie, physico-chimie, botanique, bactériologie et expérimentation animale notamment. Champ d'investigation très vaste, mais qui s'explique si l'on songe que les médicaments peuvent être d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique et qu'en outre des drogues provenant des origines les plus diverses sont couramment mélangées dans les spécialités. Inutile de mentionner que de tels mélanges ne peuvent manquer de nous poser des problèmes multiples et ardus pour la solution desquels les techniques les plus variées et les plus modernes s'avèrent nécessaires. Quelques-uns de ces problèmes portaient en eux, néluctablement, le germe de l'utilisation des méthodes microchimiques:

D'abord certaines spécialités contenaient une si faible quantité de produit actif que leur contrôle en était rendu pratiquement irréalisable par les méthodes courantes.

Nous disposions par exemple d'une ou deux boîtes de 10 ampoules de 1 ml contenant chacune 3 mg de triméthylméthoxypropénylammonium bromide. On ne peut pas toujours exiger du fabricant un trop grand nombre de conditionnements.

Ou bien encore, nous devions doser l'arsenic dans une poudre contenant 0,3 mg d'arsenite de potassium pour 325 mg soit 0,048% d'arsenic. Si on avait voulu appliquer un dosage classique, il aurait fallu minéraliser des quantités trop grandes de produit et perdre un temps précieux. Même problème pour le dosage de dragées à faible teneur en dionine, ou en aldéhyde nicotinique de la thiosemicarbazone.

En second lieu, des médicaments nouveaux, au sujet desquels la documentation était inexistante, ou d'autre part, des substances peu réactionnelles, faisaient apparaître la nécessité de disposer de méthodes précises et sûres pour la prise des constantes physiques ainsi que de méthodes d'analyse élémentaire et fonctionnelle vraiment pratiques. Lors de l'apparition des antihistaminiques par exemple, on ne disposait guère, pour leur dosage, que de l'estimation de l'azote ou des halogènes éventuels. Les curarisants de synthèse, fort peu réactionnels, sont le plus souvent dosés par leur taux d'azote ou d'halogène.

Enfin, devant l'affluence toujours plus grande des analyses, le laboratoire se trouvait dans l'obligation d'accroître son rendement par tous les moyens et celà malgré le fait qu'une analyse sur deux constitue un problème nouveau. Il fallait donc diminuer autant que possible notamment, le temps consacré à certaines opérations: prises du P. F., dosages du soufre ou de l'azote par exemple.

Les méthodes microchimiques semblaient promettre une réponse aux trois critères que nous venons d'énoncer; c'est pourquoi nous y avons recouru tout naturellement, et de plus en plus, depuis la fin de la guerre. C'est ainsi que nous avons utilisé pour la prise du P. F., le capillaire d'abord puis, le banc et le microscope de *Kofler;* ce dernier appareil nous servant occasionnellement à prendre d'autres constantes physiques.

La microsublimation fractionnée a été utilisée avec intérêt dans certains cas.

La microscopie chimique et surtout les spot-tests ont supplanté dans nos laboratoires la plupart des méthodes classiques d'identification en tubes à essai; c'est dire leur énorme intérêt pour nous.

Autre méthode microchimique, la chromatographie, sur papier surtout, nous rend constamment de très grands services; elle permet en effet quantité de séparations dans les mélanges complexes les plus divers: extraits et teintures végétales ou mélanges de sulfamidés, par exemple.

Il est devenu classique pour nous de faire appel à cette technique chaque fois que les méthodes de séparation habituelles sont mises en defaut. La spectrophotométrie est évidemment, elle aussi, largement utilisée, tant dans un but qualitatif que dans un but quantitatif; ses principales qualités sont pour nous une spécificité relative et surtout

une très grande sensibilité puisqu'on dose souvent de cette façon quelques microgrammes d'une substance.

D'autres techniques microchimiques comme la fluorométrie et la polarographie commencent à être mises à profit dans le contrôle des médicaments et le seront sans doute davantage dans l'avenir: par exemple le dosage des sels de quinine ou des vitamines B_1 et B_2 par fluorométrie.

Et ceci nous amène, pour compléter la revue des principales méthodes microchimiques utilisées en nos laboratoires, à parler de la microanalyse élémentaire et fonctionnelle, la branche peut-être la plus typique et la plus spécialisée de la microchimie.

Un département spécial y est consacré dans nos laboratoires depuis trois ans environ et je compte m'étendre davantage sur ce sujet qui constitue plus spécialement mon domaine.

Comme on le sait les microméthodes nécessitent toujours une mise au point soignée, même si le mode opératoire en a été entièrement publié; elles ne sont donc vraiment intéressantes pour un laboratoire astreint à un sérieux rendement, que si elles sont fréquemment utilisées. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes limités aux déterminations suivantes: Azote, Soufre, Halogènes, Arsenic, Phosphore, Manganèse, fonctions méthoxy et éthoxy ainsi que la Pénicilline G.

Nous pouvons, passer en revue les méthodes et les appareils utilisés à cette fin.

La pesée étant très souvent à la base des déterminations, il est normal de commencer par les balances.

Nous utilisons une semi-microbalance Sartorius au 0,01 mg pour les pesées de plus de 5 mg et une microbalance de même marque au 0,001 mg pour les quantités inférieures à 5 mg. Ceci maintient toujours l'erreur sur la pesée à moins de 0,5%.

Le laboratoire de microanalyse étant situé au sous-sol, nous n'avons pratiquement aucun ennui par suite des trépidations et ce, malgré un système de suspension très simple. L'excellent amortissement de ces balances ramène d'autre part, le temps d'une pesée à 5 ou 10 minutes selon les cas.

Pour la détermination de l'azote, nous avons choisi la méthode de *Dumas*, par suite de sa plus grande universalité. La source d'anhydride carbonique est une bouteille thermos contenant de la neige carbonique. Nous utilisons un compensateur de pression à mercure du type *Zimmermann* mais d'assez grande capacité, ceci pour nous permettre de mener à bien le dosage des mélanges ou substances à très faible teneur en azote. La combustion est réalisée par des fours électriques à déplacement automatique. Nous avons employé avec succès les rognures de cuivre métallique en lieu et place de l'oxyde de cuivre réduit dans un courant d'hydro-

gène, classiquement préconisé. Très peu de produits se sont avérés réfractaires à cette méthode.

Placés devant le choix d'une méthode de minéralisation en vue du dosage du soufre, nous avons finalement décidé d'utiliser les méthodes de fusion, principalement en raison de leur grande souplesse quant aux prises de départ; on peut en effet partir de quelques mg dans la bombe de *Parr* à 500 mg dans la bombe de *Wurzschmitt*, ceci étant fort utile pour les faibles teneurs. Il n'existe guère de substances réfractaires à cette minéralisation, dans notre cas.

Le dosage des sulfates formés est poursuivi par la gravimétrie du sulfate de baryum sur creusets de porcelaine filtrante. C'est encore, à notre connaissance, la meilleure technique, du moins après la bombe. Il est néanmoins indispensable de travailler à l'échelle semi-microchimique et de peser au moins 20 mg de sulfate de baryum pour que les erreurs relatives demeurent inférieures à 2 à 3%.

Pour la détermination des halogènes, nous utilisons également — et pour les mêmes raisons — la minéralisation à la bombe de *Parr* ou de *Wurzschmitt*. Le dosage des chlorures se poursuit soit par gravimétrie soit surtout par potentiométrie; nous utilisons à cette fin un potentiomètre — pH mètre Metrohm, couplé avec deux électrodes d'argent, l'une libre, l'autre bloquée dans un liquide conducteur et ne communiquant avec la solution de titrage que par l'intermédiaire d'un capillaire; cette technique nous donne d'excellents résultats mais, en raison de la forte concentration saline provenant de la bombe, il est nécessaire de titrer avec des solutions de nitrate d'argent N/50 ou N/25, ce qui ramène plus ou moins à l'échelle semi-microchimique comme pour le soufre.

Les bromures formés sont, eux, transformés quantitativement en bromates par l'hypochlorite en milieu alcalin tamponné à chaud. Le chlore en excès est détruit par le formiate de sodium et il n'y a plus qu'à titrer iodométriquement les bromates par le thiosulfate N/50[1]. Spécifique en présence de chlore, la méthode se caractérise par un excellent facteur de multiplication puisque chaque atome initial produit finalement six iodes. Elle est quantitative également pour l'iode.

Mais pour ce dernier halogène, nous employons surtout une technique décrite notamment par *Zimmermann*, qui est spécifique vis-à-vis du chlore et du brome. Après minéralisation à la bombe, les iodures formés sont oxydés à l'état d'iodates par le brome en milieu acide acétique — acétate de sodium. L'excès de brome est détruit par l'acide formique et on termine par une iodométrie. Ici encore, six atomes sont produits pour chaque atome initial.

En combinant ces diverses techniques, il est évidemment facile de résoudre n'importe quel mélange d'halogènes, chose fort utile dans notre cas.

Le problème du dosage de l'arsenic était particulièrement difficile en ce sens qu'il s'agissait le plus souvent de doser des traces de cet élément toxique dans des granulés, sirops etc. . . . et que, de plus, il était souvent accompagné de substances susceptibles de troubler son dosage: fer et phosphates par exemple dans les préparations reconstituantes.

Afin de pouvoir utiliser la microbombe ou, du moins de diminuer au maximum la durée de la minéralisation en partant de faibles prises, il était important de pouvoir estimer avec précision des quantités aussi petites que possibles d'arsenic.

Il était donc normal de penser à une détermination spectrophotométrique. Après la minéralisation à la bombe ou au mélange sulfoperoxydique, nous effectuons donc la spectrophotométrie du complexe arsénio-molybdique bleu: la courbe est une droite entre 10 et 80 μg d'arsenic[2]. Malheureusement diverses substances troublent ce dosage et notamment le phosphore et le silicium. Dans ces cas, nous effectuons la détermination iodométrique directe des arséniates formés selon la technique de *Friedrich*. Mais les oxydants minéraux et notamment le fer perturbent cette méthode. Dès lors il est des cas où aucune de ces méthodes n'est directement applicable: cas assez fréquent par exemple de la présence simultanée de l'arsenic, du fer et du phosphore. Nous devons alors séparer l'arsenic par précipitation au réactif de *Bougault*[3]. Il suffit, après lavage, de redissoudre dans l'acide nitrique, d'évaporer à sec et de terminer par la spectrophotométrie ou l'iodométrie. Par la combinaison de ces diverses techniques nous parvenons ainsi à doser l'arsenic dans presque tous les médicaments.

Pour le phosphore et le manganèse nous avons recours à une minéralisation sulfoperoxydique. Le dosage est poursuivi par la spectrophotométrie du complexe phosphovanadomolybdique jaune[4] ou du permanganate obtenu par la technique au persulfate[5].

La détermination des fonctions méthoxy et éthoxy s'opère de la manière classique: arrachement du groupe alkyle par l'acide iodhydrique et distillation des iodures d'alkyle selon le procédé de *Zeisel*. Le dosage est poursuivi selon *Vieböck* et *Brecher* en recevant les iodures dans du brome et dosant enfin les iodates formés. Le laveur, toutefois, est garni d'une solution d'hydrate d'hydrazine comme le préconisent *Franzen*, *Hegemann* et *Disse*[6]. De plus, nous utilisons comme source d'anhydride carbonique, de la neige carbonique en bouteille thermos, comme pour le Micro-Dumas.

Le département de microanalyse exécute encore les déterminations de la Pénicilline G selon U.S.P. XIV ainsi que des dosages d'humidité et de cendres à l'échelle microchimique.

Toutes ces microméthodes sont, comme on le sait, très rapides et très précises. L'erreur relative est toujours inférieure à 3% sauf dans

le dosage de l'arsenic lorsqu'il est nécessaire de le séparer au préalable. La durée du travail effectif ne dépasse 50 minutes que dans ce même cas ainsi que lors du dosage des fonctions méthoxy et éthoxy.

Et ceci nous amène à noter le gain de temps obtenu chaque fois qu'il est possible de travailler à l'échelle microchimique plutôt qu'à l'échelle semi-microchimique. Si cette remarque perd de sa force pour la gravimétrie et la potentiométrie, elle est par contre nettement d'application en ce qui concerne le Micro-Dumas, le micro-méthoxy et toutes les méthodes qui passent par une minéralisation sulfoperoxydique. Ainsi par exemple, pour la codéine, le temps de distillation, lors du dosage du méthoxy, est de 2 à 4 heures à l'échelle semi-microchimique; il peut être ramené à 50 minutes à l'échelle microchimique.

La difficulté principale pour nous, vient du fait que nous devons effectuer assez souvent de véritables analyses de traces en raison de la faible teneur du médicament en produit actif contenant l'élément à doser. Cela suppose bien souvent une minéralisation semi-micro ou même carrément microchimique qu'on doit faire suivre d'une détermination, elle, vraiment microchimique avec l'inconvénient que comporte l'énorme quantité de matière minéralisante nécessaire (peroxyde de sodium, acide sulfurique etc. . . .) et la présence des autres constituants du médicament ainsi que de leurs impuretés propres.

Pour donner une idée de l'importance croissante des méthodes microanalytiques dans le contrôle des médicaments, nous donnerons seulement la statistique des microdosages élémentaires et fonctionnels effectués au cours de ces dernières années:

1952: 72 (année de départ)
1953: 430
1954: 522

Une progression similaire a été notée dans presque tous les domaines d'application de la microchimie au contrôle des médicaments et l'on peut dire que ces méthodes tendent à supplanter progressivement chez nous bien des méthodes classiques.

Par les multiples possibilités qu'elle nous a apporté, travail sur des prises très faibles, déterminations élémentaires et fonctionnelles pratiques, économie substantielle de temps, la pratique de la microchimie a signifié pour nous, un sérieux accroissement des possibilités d'investigation et en outre une augmentation appréciable du rendement général.

Elle est devenue incontestablement un outil indispensable au service du contrôle des médicaments.

Résumé

Le but et l'origine du Service de Contrôle des Médicaments de l'Association Pharmaceutique Belge sont d'abord évoqués brièvement. Les

problèmes posés à ce laboratoire conduisaient tout naturellement à l'utilisation de la plupart des méthodes microanalytiques. L'article se poursuit par une revue des différentes techniques utilisées en s'étendant davantage sur l'analyse élémentaire et fonctionnelle. Il décrit ensuite les méthodes spéciales utilisées à cette fin et dont le choix a été orienté par les conditions particulières à l'analyse des médicaments: analyses de traces par exemple. L'échelle microchimique s'est souvent avérée plus intéressante que l'échelle semi-microchimique. L'exposé se termine par une statistique montrant l'importance croissante de ces méthodes dans le contrôle des médicaments.

Zusammenfassung

Über die Aufgaben des „Service de Contrôle des Médicaments de l'Association Pharmaceutique Belge" wird kurz berichtet. Diese führten natürlich zur Anwendung einer Reihe von mikroanalytischen Methoden. Die Übersicht über die verschiedenen angewandten Verfahren erstreckt sich auf die Elementaranalyse und die Bestimmung der funktionellen Gruppen. Hierbei werden die für die Arzneimittelanalyse besonders geeigneten Methoden, z. B. die Spurenbestimmungen, beschrieben. Der Mikromaßstab erwies sich hierbei oft als zweckmäßiger im Vergleich zum Halbmikromaßstab. Schließlich wird mit einer Statistik die steigende Bedeutung dieser Methoden für die Arzneimittelkontrolle gezeigt.

Summary

The object and the origin of the Service de Contróle des Médicaments de l'Association Pharmaceutique Belge are discussed briefly. The problems presented to this laboratory lead quite naturally to the use of the majority of the microanalytical methods. There follows a review of the various techniques employed in extending these to functional and elementary analyses. A description is given of the special methods used for this purpose. The choice of such procedure is dictated by the conditions imposed especially in the analysis of medicinals, such as the determination of traces. The microchemical scale often proves to be more interesting than the semimicro scale. The paper concludes with statistics showing the growing importance of these methods in the inspection of medicinals.

Bibliographie

[1] *L. M. White* et *M. D. Kilpatrick*, Analyt. Chemistry **22**, 1049 (1950).
[2] *G. Charlot* et *R. Gauguin*, Dosages colorimétriques. Paris: Masson. 1952. p. 107.
[3] *O. P. Case*, Analyt. Chemistry **20**, 902 (1948).
[4] *T. S. Ma* et *J. D. McKinley*, Jr., Mikrochim. Acta [Wien] **1953**, 4.
[5] *G. Charlot* et *R. Gauguin*, l. c., p. 177.
[6] *Fr. Franzen*, *W. Hegemann* et *W. Disse*, Mikrochem. **39**, 277 (1952).

Fisons Pest Control Ltd., Chesterford Park Research Station, Near Saffron Walden, Essex, England

Methoden zur Rückstandsbestimmung von Insektiziden in pflanzlichem Material

Von

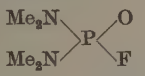
I. Otter

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 14. April 1955)

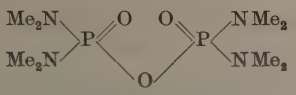
Die toxischen Eigenschaften der als Insektizide verwendeten Verbindungen erstrecken sich in ihrer Wirkung auch auf höhere Lebewesen. Es ist daher von großer Wichtigkeit, damit behandelte Pflanzen, die als Genuß- oder Futtermittel in Betracht kommen, mit Sicherheit auf Rückstände dieser Verbindungen prüfen zu können. Zu diesem Zwecke wurden in den Forschungslaboratorien unserer Firma Methoden für folgende Insektizide ausgearbeitet und an einer Reihe von Pflanzen mit Erfolg angewandt:

1. Bisdimethylaminofluorophosphinoxyd



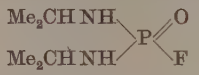
Dimefox genannt und im Handel als Hanane, S 14, oder Terra-sytam erhältlich.

2. Bisdimethylaminophosphorsäureanhydrid oder Octamethylpyrophosphoryltetraamid



Schradan genannt und im Handel als Pestox 3, Pestox 99, Sytam und Tetrax erhältlich.

3. Bis-(monoisopropylamino)-fluorophosphinoxyd



Mipafox genannt und im Handel als Isopestox Capstiks erhältlich.

Es ist zu erwarten, daß die für diese Verbindungen ausgearbeiteten Methoden auch zur Bestimmung von anderen Insektiziden mit ähnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften herangezogen werden können.

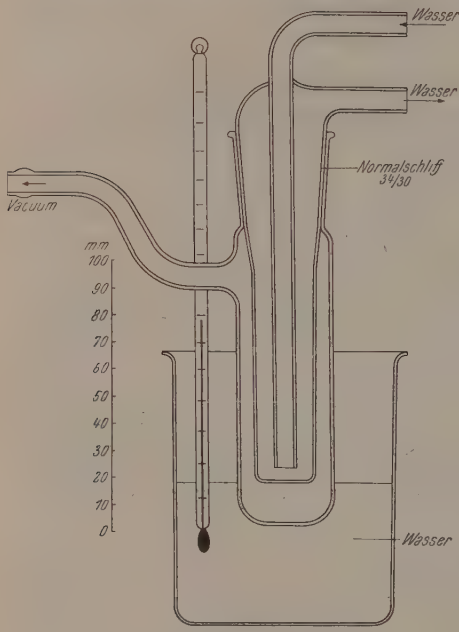


Abb. 1. Mikrosublimationsapparat nach *Klein* und *Werner* modifiziert zur Mikrodestillation

Auf Grund der an Tierversuchen ermittelten Toxizität von Schradan wird als zulässige Grenze für diese Verbindung ein Gehalt von 3 p. p. m. in Genußmitteln allgemein angenommen.

Mipafox hat ähnliche toxische Wirkung; es ist daher zu erwarten, daß die zulässige Grenze für diese Verbindung in derselben Größenordnung festgesetzt wird.

Dimefox ist, verglichen mit diesen Verbindungen, erheblich giftiger, wird aber in kurzer Zeit von der Pflanze zu vollkommen harmlosen Verbindungen abgebaut. Die Grenze der tolerierbaren Rückstände ist zur Zeit noch immer Gegenstand von Erörterungen.

Bei der Ausarbeitung unserer Methoden setzten wir uns das Ziel, eine Empfindlichkeit von 0,05 bis 0,1 mg/kg zu erreichen, und da der Großteil der Insektizide organische Phosphorverbindungen sind, schien es zweckmäßig, die Methoden auf die Bestimmung des Phosphors zu gründen.

Der erste, allen diesen Methoden gemeinsame Schritt besteht in der vollständigen Extraktion des Insektizids aus dem Untersuchungsmaterial. Diese wird mit Chloroform durchgeführt und jeweils auf die Art des Untersuchungsmaterials und die zur Verfügung stehenden Hilfsmittel abgestimmt. Die Vollständigkeit der Extraktion läßt sich durch einen Modellversuch mit radioaktiven Insektiziden am Geiger-Müller-

Zähler überprüfen. Einige dieser Extraktionsmethoden werden später an Hand von Beispielen angeführt.

Die Extrakte enthalten erhebliche Mengen an chloroformlöslichen, natürlichen Phosphorverbindungen. Deren Menge schwankt nicht nur von Pflanze zu Pflanze, sondern hängt auch weitgehend vom Entwicklungsstadium der extrahierten Pflanzenteile ab. Es ist daher notwendig, das zu bestimmende Insektizid möglichst quantitativ davon abzutrennen. Dies ist in einfacher Weise durch eine Mikrodestillation zu erreichen.

Wie unsere Versuche zeigten, ist es möglich, Mengen von 30 µg *Mipafox* und *Schradan* in dem dafür modifizierten Mikrosublimationsapparat nach *Klein* und *Werner*[1] (Abb. 1) mit über 90% Ausbeute zu destillieren.

Destillation des Mipafox

Den gesammelten Chloroformextrakt bringt man in das Destillationsgefäß, verbindet dessen seitlichen Ansatz mit einem Kühler, verschließt die obere Öffnung mit einem Schliffstopfen und destilliert den Großteil des Chloroforms ab. Man entfernt dann den Kühler, fügt einige Glasringe zur Verhütung eines Siedeverzuges zu und erwärmt am asserbad, um Reste von Chloroform zu vertreiben. Nun verschließt man das Gefäß mit einem Schliffstopfen und evakuiert langsam an der Wasserstrahlpumpe. Zur Destillation ersetzt man den Schliffstopfen durch den peinlich gereinigten Kühlfinger und verbindet den seitlichen Ansatz mit der Ölpumpe. Die Destillation wird bei 1 mm Hg auf einem auf 60 bis 70° C erwärmten Wasserbad ausgeführt und ist nach 25 Minuten beendet. Man unterbricht das Vakuum, entfernt das Wasserbad, nimmt den Kühlfinger vorsichtig heraus und wäscht ihn mit ungefähr 10 ml Chloroform (p. a.) quantitativ. Nach Zusatz von 5 ml 30volumprozentiger Schwefelsäure dampft man das Chloroform in einem Kjeldahlkölbchen ab, setzt 5 ml 10%ige Ammoniumpersulfatlösung zu und verascht. Bei nicht vollständiger Entfärbung der Lösung setzt man ein bis zwei Tropfen Wasserstoffperoxyd zu. Zur Hydrolyse verdünnt man mit dest. Wasser und dampft bis zum Auftreten der Schwefelsäureschwaden ein. In der so erhaltenen Lösung wird der Phosphor nach der Methode von *Berenblum* und *Chain*[2] kolorimetrisch bestimmt.

Destillation des Schradan

Die Destillation wird im selben Apparat (Abb. 1) ausgeführt. Man verfährt wie bei der Bestimmung des Mipafox und destilliert bei 1 mm Hg am kochenden Wasserbad 45 Minuten.

Destillation des Dimefox

Dimefox zeigt bei 25° C einen Dampfdruck von 0,36 mm Hg[3]. Eine Destillation dieser Verbindung in dem Apparat nach Abb. 1 führt leicht

zu Verlusten. Um dies zu verhindern, wird die Destillation mit einem Gemisch von Glycerin und Äthylenglykol in dem dafür konstruierten Apparat nach Abb. 2 ausgeführt.

Zu den Extraktionsrückständen, die sich nach Abdestillieren des Chloroforms am Boden des kugelförmigen Gefäßes befinden, fügt man

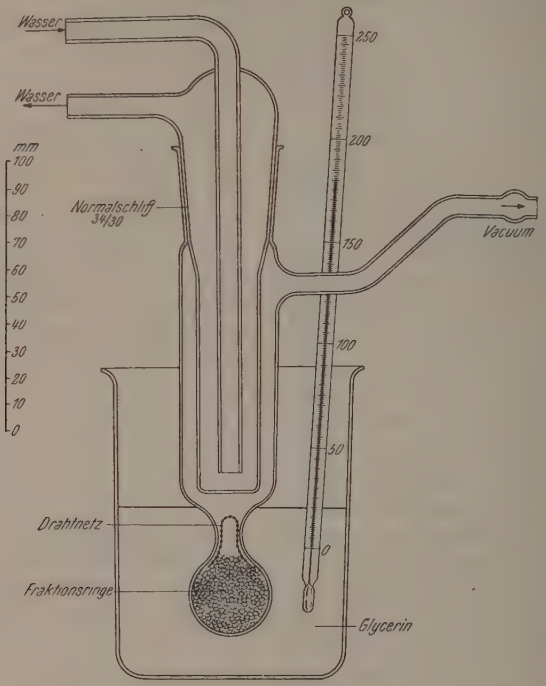


Abb. 2. Mikrodestillationsapparat

0,25 ml Glycerin und 1 bis 2 Tropfen Äthylenglykol, füllt das kugelförmige Gefäß bis zum Hals mit Fraktionierringen (Durchmesser ungefähr 3 mm) und schiebt in den Hals ein gebogenes Drahtnetz, das bei eventuellem Stoßen während der Destillation das Hinaufspringen der Ringe gegen den Kühler verhindert. Das gefüllte Destillationsgefäß verschließt man mit einem Schliffstopfen und evakuiert vorsichtig an der Wasserstrahlpumpe. Nun ersetzt man den Schliffstopfen durch den Kühlfinger und führt die Destillation auf einem auf 180 bis 200° C erhitzten Glycerinbad an der Wasserstrahlpumpe aus. Nach 10 Minuten entfernt man das Glycerinbad, läßt abkühlen und wäscht den Kühlfinger quantitativ mit dest. Wasser. Zu 10 ml wäßriger Lösung fügt man

4 ml 1-n Perchlorsäure und hält die Lösung 30 Minuten im Thermostaten bei 25° C. Anschließend extrahiert man zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform. Den wäßrigen Rückstand, der den Phosphor des Dimefox als phosphorige und fluorophosphorige Säure enthält, bringt man in ein Kjeldahlkölbchen, setzt 4 ml n Schwefelsäure zu und verfährt weiter wie bei der Bestimmung des Schradan und Mipafox. Die kontrollierte Hydrolyse gestattet, Dimefox von Tridimethylaminophosphorsäure, einer Begleitsubstanz der im Handel erhältlichen Dimefox-Produkte, zu trennen. Die Ausbeute der Destillation für 30 μg Dimefox beträgt 95 bis 100%.

Die Untersuchung von pflanzlichem Material

Kohlsprossen

50 g Kohlsprossen werden mit 5 ml 1-n Natronlauge und 25 bis 50 ml technischem Chloroform mazeriert. Nur Mazeratoren mit einem Antrieb von oben sind für direktes Mazerieren mit Chloroform geeignet. Falls ein solcher nicht zur Verfügung steht, ist es besser, einen wäßrigen Auszug zu bereiten und diesen mit Chloroform zu extrahieren, was allerdings mehr Zeit und größere Mengen Chloroform erfordert. Das Mazerat extrahiert man mit Chloroform 1 bis 2 Stunden im Soxhletapparat. Den Chloroformextrakt bringt man in den Mikrodestillationsapparat (Abb. 1) und führt die Destillation und Bestimmung nach der beschriebenen Methode (Schradan) aus.

Die erhaltenen Blindwerte aus 50 g Kohlsprossen entsprechen 0,3 bis 0,8 μg Phosphor (0,03 bis 0,07 p. p. m. Schradan). Die in Klammer angeführten Blindwerte wurden praktisch ermittelt, es ist jedoch anzunehmen, daß sie auch mit den Destillationsmethoden für die anderen Verbindungen in derselben Größenordnung liegen.

Zitronen

a) *Schalen:*

25 g Zitronenschalen werden mit 30 ml dest. Wasser mazeriert. Das Mazerat wird in einer Reibschale mit Trockeneis zerrieben und nach dem Auftauen zentrifugiert. Den festen Anteil bringt man in eine Extraktionshülse und extrahiert 1 Stunde mit Wasser. Die vereinigten wäßrigen Auszüge extrahiert man mit Chloroform. Den so erhaltenen Chloroformextrakt verarbeitet man wie üblich. Der erhaltene Blindwert für 25 g Zitronenschalen entspricht 0,5 bis 0,75 μg Phosphor (0,12 p. p. m. Schradan).

b) *Frucht:*

50 g geschälte Zitronen werden mit 2 bis 3 g Natriumacetat und Wasser mazeriert. Das Mazerat wird wie das der Zitronenschalen weiterverarbeitet. Der erhaltene Blindwert für 50 g Zitronenfruchtfleisch entspricht 0,9 bis 1,2 μg Phosphor (0,08 bis 0,1 p. p. m. Schradan).

Orangen

a) *Schalen:*

1. 25 g Orangenschalen werden mit 30 ml technischem Chloroform mazeriert. Das Mazerat wird zentrifugiert, den festen Anteil bringt man in

Analysenergebnisse aus pflanzlichem Material nach Zusatz gemessener Mengen Insektizid

Tabelle 1. Schradan

Untersuchtes Material	p. p. m. Schradan zugesetzt	p. p. m. Schradan gefunden	% gefunden
Kohlsprossen	0,52	0,48	92
	0,52	0,49	94
	0,67	0,60	89
	0,67	0,61	90
	1,83	1,63	89
	1,83	1,67	91
Zitronen:			
a) Frucht	0,25	0,15	60
	0,78	0,60	77
	0,78	0,58	74
b) Schalen	0,50	0,42	84
	0,50	0,34	68
	1,55	1,23	79
Orangen:			
a) Frucht	0,84	0,65	77
	0,84	0,62	73
	0,59	0,42	70
b) Schalen	1,68	1,28	77
	1,68	1,20	72
	1,18	0,89	75
	1,18	0,79	67

Tabelle 2. Mipafox

Untersuchtes Material	p. p. m. Mipafox zugesetzt	p. p. m. Mipafox gefunden	% gefunden
Tomaten	0,58	0,51	87
	0,58	0,49	85
	1,44	1,23	85
	1,16	0,99	86
	2,88	2,70	94
Gurken	0,32	0,30	94
	0,32	0,24	76
	0,64	0,57	89
	0,64	0,64	100
	1,96	1,76	91
	1,96	1,76	91

Tabelle 3. Dimefox

Untersuchtes Material	p. p. m. Dimefox		% gefunden
	zugesetzt	gefunden	
Orangen:			
a) Frucht	0,3	0,21	73
	0,3	0,23	76
b) Schalen	0,6	0,50	84
	0,6	0,53	88
Rüben	0,93	0,75	80
	0,67	0,59	88
	0,67	0,62	92
	0,37	0,32	88
	0,37	0,35	96
Zuckerrüben	0,39	0,36	92
	0,39	0,37	93
	0,95	0,92	97
	0,95	0,89	94

eine Extraktionshülse und extrahiert mit Chloroform eine Stunde im Soxhletapparat. Mit den vereinigten Chloroformextrakten verfährt man weiter, wie vorher beschrieben. Der erhaltene Blindwert für 25 g Orangenschalen entspricht 0,3 μg Phosphor (0,05 p. p. m. Schradan).

2. 50 g Schalen werden mit Trockeneis in einer Reibschale zerrieben, nach dem Auftauen erwärmt man unter Rückflußkühlung am Wasserbad, hebert das Chloroform nach 10 Minuten ab und ersetzt es durch frisches: dies wiederholt man dreimal. Die vereinigten Chloroformextrakte werden wie üblich weiterverarbeitet. Der Blindwert für 50 g Orangenschalen entspricht 0,5 μg Phosphor (0,05 p. p. m. Dimefox).

b) *Frucht:*

1. 50 g Orangenfruchtfleisch werden mit 30 ml technischem Chloroform und 2 bis 3 g Natriumacetat mazeriert. Das so erhaltene Mazerat wird wie das der Schalen (1.) weiterverarbeitet. Der Blindwert für 50 g Orangenfruchtfleisch entspricht 0,28 μg Phosphor (0,025 p. p. m. Schradan).

2. 100 g Orangenfruchtfleisch werden mit 2 bis 3 g Natriumacetat und Trockeneis in einer Reibschale zerrieben und wie die Schalen in (2.) weiterverarbeitet. Der Blindwert für 100 g Orangenfruchtfleisch entspricht 0,1 bis 0,3 μg Phosphor (0,005 bis 0,015 p. p. m. Dimefox).

Zuckerrüben und Rüben

50 g Zuckerrüben oder Rüben werden mit 5 ml 1-n Natronlauge und 30 ml technischem Chloroform mazeriert. Das Mazerat wird zentrifugiert und der feste Anteil im Soxhletapparat mit Chloroform extrahiert. Der Chloroformextrakt wird wie üblich weiterverarbeitet. Der Blindwert für 50 g Rüben oder Zuckerrüben entspricht 0,2 bis 0,5 μg Phosphor (0,02 bis 0,05 p. p. m. Dimefox).

Tomaten und Gurken

50 g Tomaten oder Gurken werden mit 30 ml technischem Chloroform mazeriert, das Mazerat zentrifugiert und der feste Rückstand in einer Reibschale mit Trockeneis und 30 ml Chloroform zerrieben. Nach dem Auftauen wird abermals zentrifugiert und der feste Rückstand mit Chloroform gewaschen. Die vereinigten Chloroformextrakte werden wie üblich weiterverarbeitet. Der Blindwert für 50 g Tomaten entspricht 0,4 μg Phosphor (0,05 p. p. m. Mipafox). Der Blindwert für 50 g Gurken entspricht 0,2 μg Phosphor (0,02 p. p. m. Mipafox).

Die in den Tabellen 1, 2 und 3 angegebenen Werte entsprechen dem Zusatz einer gemessenen Menge Insektizid vor dem Mazerieren des Untersuchungsmaterials. Wie aus den Blindwerten und den gefundenen Werten zu ersehen, ist es möglich, einen Gehalt von 0,1 p. p. m. Insektizid noch einwandfrei festzustellen.

Bei Serienuntersuchungen kann eine geschulte Arbeitskraft fünf bis sechs Rückstandsanalysen an einem Arbeitstag ausführen.

Ich danke an dieser Stelle Dr. *G. S. Hartley* für sein reges Interesse an diesen Arbeiten, Dr. *D. F. Heath* für die Informationen über die physikalischen und chemischen Eigenschaften der geprüften Insektizide, Dr. *A. Zeller* für wertvolle Anregungen und den Direktoren von Fisons Pest Control Limited für die freundliche Erlaubnis und Gelegenheit, im Rahmen der Mikrochemie-Tagung darüber sprechen zu können.

Zusammenfassung

Es wurden Methoden zur Rückstandsbestimmung von organischen, phosphorhältigen Insektiziden in pflanzlichem Material ausgearbeitet, um einen Gehalt von weniger als 0,1 p. p. m. dieser Verbindungen mit Sicherheit zu erfassen. Diese Methoden bestehen aus einer auf das Untersuchungsmaterial abgestimmten Chloroformextraktion, der Trennung der Insektizide von den chloroformlöslichen natürlichen Phosphorverbindungen durch eine Mikrodestillation und der Ermittlung des Gehaltes an Insektizid durch kolorimetrische Bestimmung des Phosphors.

Summary

Methods for residue analyses of organophosphorus insecticides in plant material are described, whereby the presence of less than 0.1 p. p. m. of these compounds may be correctly estimated. The working procedure is based on a chloroform extraction of the plant material, followed by the separation by microdistillation of the insecticide from the naturally occuring chloroform-soluble phosphorus compounds and a colorimetric determination of the phosphorus of the insecticide.

Résumé

Description de méthodes d'analyse de résidus d'insecticides organiques phosphorés dans les végétaux. Ces méthodes permettent d'estimer correctement des proportions de ces composés inférieures à 0,1 ppm. La technique opératoire comporte une extraction chloroformique effectuée sur la substance végétale suivie d'une séparation par microdistillation de l'insecticide des éventuels composés naturels phosphorés solubles dans le chloroforme et d'un dosage colorimétrique du phosphore de l'insecticide.

Diskussion

H. *H. Chomse* (Berlin): Wovon hängt die Wiedergewinnung der Insektizide aus den verschiedenen pflanzlichen Materialien ab? Ist sie abhängig von den einzelnen untersuchten Produkten oder von der jeweils angewandten Methode? Die angegebenen Schwankungen variieren je nach dem untersuchten Produkt.

Fr. *I. Otter:* Die Streuung in natürlichem pflanzlichem Untersuchungsmaterial bewegt sich meistens in der Größenordnung von 10%.

H. *H. Chomse:* Das schon, aber einige Werte liegen ja doch außerhalb dieser Streuung, sodaß man fragen könnte, wird das betreffende Insektizid z. B. in den Schalen abgebaut oder ist die Streuung in der Art des pflanzlichen Materials begründet?

Fr. *I. Otter:* Es kann sowohl in der Art des pflanzlichen Materials liegen, wie in die Art des Insektizids an sich.

Literatur

[1] *G. Klein*, Handbuch der Pflanzenanalyse. I. Bd. Wien: J. Springer. 1931. S. 317.

[2] *I. Berenblum* und *E. Chain*, Biochemic. J. **32**, 295 (1938).

[3] *W. Ripper*, 3rd Intern. Congr. of Crop Protection, Paris. 1952.

Aus dem Biochemischen Forschungslaboratorium der Aschaffenburger Zellstoffwerke A. G., Stockstadt a. M.

Zur chromatographischen Trennung der Vitamine der B_{12}-Gruppe. II[1]

Der Einfluß von Anionen auf die Trennung der Vitamine der B_{12}-Gruppe auf Zellulose im Entwicklersystem sek. Butanol-Wasser

Von

Wilhelm Friedrich, Gisela Groß und Konrad Bernhauer

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 8. März 1955)

Wie wir kürzlich berichteten, läßt sich die Trennung von Vitaminen der B_{12}-Gruppe in der Zellulosepulver-Säule sowie im Papierchromatogramm durch Kaliumperchlorat beträchtlich verbessern[1]. Weitere Untersuchungen zeigten, daß auch eine Reihe anderer Salze ähnlich wie Kaliumperchlorat wirken. Es handelt sich dabei vor allem um die Natrium- bzw. Kaliumsalze starker einbasischer, mehratomiger Säuren, während Salze schwacher oder mehrbasischer Säuren, wie auch Salze der einfachsten Säuren (z. B. NaCl) diesen Effekt nicht ausüben. Wir schlagen vor, die günstige Beeinflussung der chromatographischen Trennung als „chromatotropen" Effekt, bzw. Salze, die diese Erscheinung verursachen, als „chromatotrop" zu bezeichnen. Besonders bemerkenswert ist, daß jene chromatotropen Salze, die Lösungsvermittler sind (z. B. Alkalisalze der Perchlorsäure, Camphersulfonsäure und Trichloressigsäure sowie Na-Tetraphenyloborat), in der Papierchromatographie stark salzhaltiger Proben der B_{12}-Vitamine wertvolle Dienste leisten, indem sie solche Salzstörungen völlig bzw. größtenteils beseitigen.

Die chromatotropen Salze können je nach ihrer Konzentration im Entwickler die Wanderung der B_{12}-Faktoren während der Chromatographie sowohl verlangsamen als auch beschleunigen. Diese Effekte könnten evtl. durch die Annahme gedeutet werden, daß Komplexe bzw. Aggregate[2] zwischen den B_{12}-Vitaminen und den betreffenden

Anionen entstehen, die dann ihre eigenen R- bzw. R_f-Werte haben, oder daß in Gegenwart der betreffenden Anionen das Adsorptionsmittel (Zellulose) verändert wird. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bietet die Vorstellung, daß das System Zellulose + Entwickler eine halbdurchlässige Membran darstellt, durch die die B_{12}-Arten während der Chromatographie diffundieren müssen. Versuche in Diffusionskammern, in denen sich beiderseits einer semipermeablen Zellulosemembran der gleiche Entwickler mit einem chromatotropen Salz in gleicher Konzentration befanden, zeigten tatsächlich, daß die Diffusionsgeschwindigkeit der B_{12}-Vitamine durch die Membran von der Salzkonzentration abhängt, und zwar in ähnlichem Maß wie die R_f-Werte in der Papierchromatographie.

Methodik und Ergebnisse

Säulenchromatographie von B_{12}-Vitaminen unter Verwendung verschiedener Salze im Entwickler

Die Säulen wurden wie bereits beschrieben bereitet[1] (Säulendurchmesser 1,15 cm, Schichthöhe der Zellulose etwa 8 cm). Die zu chromatographierende Substanz wurde in Form eines Kieselgurpräparates[3] in die Säulen eingefüllt. Der Entwickler bestand aus 77 Vol.-% sek. Butanol und 23 Vol.-% Wasser + 1 ml 10%iger wäßriger Blausäurelösung in 1 l, sowie verschiedenen Salzen.

Tabelle 1 enthält eine Auswahl von Salzen, die sich in ihrer Wirkung unterscheiden, samt den Trenneffekt kennzeichnenden Angaben. Die R_f-Werte sind ein Gradmesser der „Dispersion", also der Entfernung der einzelnen Zonen voneinander. Trotz guter Dispersion kann aber die Trennung mangelhaft sein, wenn die Zonen diffus oder „unscharf" sind, also z. T. ineinander übergehen. Daher ist auch die „Schärfe", also Schmalheit der Zonen, ein wichtiges Kriterium für den Trenneffekt. Tabelle 1 zeigt, daß Salze, die starken einbasischen, mehratomigen Säuren entstammen, chromatotrop wirken, also den Trenneffekt der Chromatographiersäulen erhöhen. Hierher gehören Verbindungen verschiedenster Zusammensetzung, wie Perchlorate, Nitrate, Trichloracetate, Natriumtetraphenyloborat, camphersulfonsaures Natrium usw. Salze einfacher Säuren, wie z. B. NaCl, Salze mehrbasischer Säuren sowie Salze schwacher Säuren erhöhen die Dispersion nicht bzw. verursachen sogar ein Ineinanderfließen der Zonen (nicht-chromatotrope Salze).

Für die Erhöhung des Trenneffektes sind allein die Anionen der betreffenden Salze verantwortlich, da sich Natrium- und Kaliumsalze gleicher Säuren in der Regel gleich verhalten. Ammoniumsalze bewährten sich nicht; sie können zur Chromatographie inkompletter B_{12}-Faktoren auch deshalb nicht verwendet werden, weil sie sauer reagieren und die inkompletten Faktoren z. T. in ihre Hydroxo-Form überführen, wodurch oft mehrere Zonen entstehen. Nicht salzartige Stoffe, wie z. B. 8-Hydroxychinolin, Glycerin, Glucose, Harnstoff und Thioharnstoff, sind in geringen Konzentrationen (0,01 Mol/1 l) praktisch ohne Einfluß.

Tabelle 1. Trennung verschiedener Vitamine der B_{12}-Gruppe in der Zellulosepulver-Säule unter Verwendung verschiedener Salze im Entwickler

Salz	Salzkonz. im Entwickler		*R*-Wert der Vitamin-B_{12}-Faktoren				Zonentrennung
	g in 100 ml	Mole pro l	Faktor I	Vit. B_{12}	Faktor III	Faktor V	
ohne	—	—	0,55	0,34	0,23	0,18	I + II diffus, III + V ungetrennt
K-Perchlorat	gesättigt	0,01	0,38	0,27	0,15	0,07	scharf
K-Perchlorat	½ gesättigt	0,005	0,46	0,32	0,12	0,06	scharf
Na-Perchlorat	0,34	0,024	0,43	0,25	0,11	0,05	scharf
$NaClO_4 \cdot H_2O$	0,17	0,012	0,5	0,28	0,12	0,09	scharf
$NaClO_4 \cdot H_2O$	0,08	0,005	0,52	0,26	0,09	0,06	scharf
$KClO_3$	gesättigt	0,01	0,55	0,31	0,12	0,08	unscharf
$KClO_3$	½ gesättigt	0,005	0,5	0,32	0,13	0,08	unscharf
$NaClO_3$	0,26	0,025	0,56	0,28	0,12	0,08	sehr scharf
$NaClO_3$	0,13	0,012	0,54	0,35	0,15	0,10	sehr scharf
$KBrO_3$	gesättigt	0,01	0,51	0,27	0,18	0,12	sehr scharf
$KBrO_3$	½ gesättigt	0,005	0,53	0,28	0,13	0,07	sehr scharf
$NaBrO_3$	0,18	0,01	0,56	0,35	0,21	0,11	sehr scharf
$NaBrO_3$	0,09	0,005	0,5	0,29	0,22	0,12	sehr scharf
KNO_3	0,1	0,01	0,58	0,37	0,17	0,09	sehr scharf
KNO_3	0,05	0,005	0,65	0,29	0,14	0,10	sehr scharf
$NaNO_3$	0,085	0,01	0,65	0,34	0,14	0,10	sehr scharf
$NaNO_3$	0,043	0,05	0,66	0,27	0,17	0,10	sehr scharf

Trennung verschiedener Vitamine der B_{12}-Gruppe in der Zellulosepulver-Säule unter Verwendung verschiedener Salze im Entwickler

Fortsetzung von Tabelle 1.

Salz	Salzkonz. im Entwickler		*R*-Wert der Vitamin-B_{12}-Faktoren				Zonentrennung
	g in 100 ml	Mole pro l	Faktor I	Vit. B_{12}	Faktor III	Faktor V	
$ClCH_2 \cdot CO_2Na$	0,116	0,01	0,72	0,45	0,21	0,13	unscharf
$ClCH_2 \cdot CO_2Na$	0,058	0,005	0,61	0,40	0,17	0,11	unscharf
$Cl_2CH \cdot CO_2Na$	0,15	0,01	0,67	0,38	0,13	0,10	scharf
$Cl_2CH \cdot CO_2Na$	0,076	0,005	0,70	0,37	0,14	0,09	scharf
$Cl_3C \cdot CO_2Na$	0,18	0,01	0,62	0,27	0,11	0,06	sehr scharf
$Cl_3C \cdot CO_2Na$	0,09	0,005	0,53	0,32	0,13	0,07	sehr scharf
$Br_2CH \cdot CO_2Na$	0,24	0,01	0,59	0,36	0,10	0,06	sehr scharf
$Br_2CH \cdot CO_2Na$	0,12	0,005	0,53	0,35	0,10	0,06	sehr scharf
Na-Tetraphenyloborat	0,17	0,0025	0,56	0,26	0,10	0,04	sehr scharf
Na-Tetraphenyloborat	0,086	0,00125	0,51	0,26	0,13	0,06	scharf
Camphersulfonsaures Na	0,27	0,01	0,56	0,24	0,07	0,04	sehr scharf
	0,136	0,005	0,42	0,29	0,09	0,04	sehr scharf
2,4-Dichlorbenzoesaures Na	0,21	0,01	0,56	0,25	0,10	0,04	sehr scharf
	0,11	0,005	0,50	0,28	0,07	0,05	sehr scharf
α-Naphthalinsulfosaures Na	0,23	0,01	0,53	0,26	0,09	0,05	sehr scharf
	0,11	0,005	0,52	0,27	0,11	0,08	sehr scharf
K-Oxalat	0,031	0,0017	0,45	0,26	0,15	0,10	unscharf
K-Tartrat	0,035	0,0015	0,51	0,31	0,20	0,12	unscharf

Tabelle 2. Papierchromatographische Trennung verschiedener Vitamine der B_{12}-Gruppe unter Verwendung verschiedener Salze im Entwickler

Nr.	Salz	Salzkonz. im Entwickler		R_f-Werte der B_{12}-Faktoren			Dispersion* mm
		g in 100 ml	Mole pro l	Vit. B_{12}	Faktor III	ψ-Vit. B_{12}	
1	ohne	—	—	0,31	0,24	0,22	22,0
2	$KClO_4$	gesättigt	0,01	0,34	0,26	0,14	44,0
3	$NaClO_4 \cdot H_2O$	0,34	0,024	0,32	0,24	0,14	40,5
4	$KClO_3$	gesättigt	0,01	0,25	0,18	0,10	32,0
5	$NaClO_3$	0,13	0,012	0,28	0,21	0,14	34,0
6	KNO_3	0,10	0,01	0,27	0,20	0,13	33,0
7	$NaNO_3$	0,085	0,01	0,27	0,20	0,13	32,5
8	$ClCH_2 \cdot CO_2Na$	0,116	0,01	0,27	0,29	0,13	31,0
9	$Cl_2CH \cdot CO_2Na$	0,151	0,01	0,32	0,25	0,16	37,5
10	$Cl_3C \cdot CO_2Na$	0,185	0,01	0,34	0,26	0,14	45,0
11	Na-Tetraphenyloborat	0,171	0,005	0,33	0,25	0,13	44,0
12	Camphersulfonsaures Na	0,272	0,01	0,33	0,25	0,24	40,5
13	KCl	0,074	0,01	0,25	0,18	0,13	26,0
14	K_2HPO_4	0,174	0,01	0,20	0,14	0,11	19,5
15	Na_2SO_4	0,142	0,01	0,20	0,14	0,12	20,0
16	ohne	—	—	0,31	0,25	0,22	20,0

* Entfernung zwischen den extremen Flecken in mm.

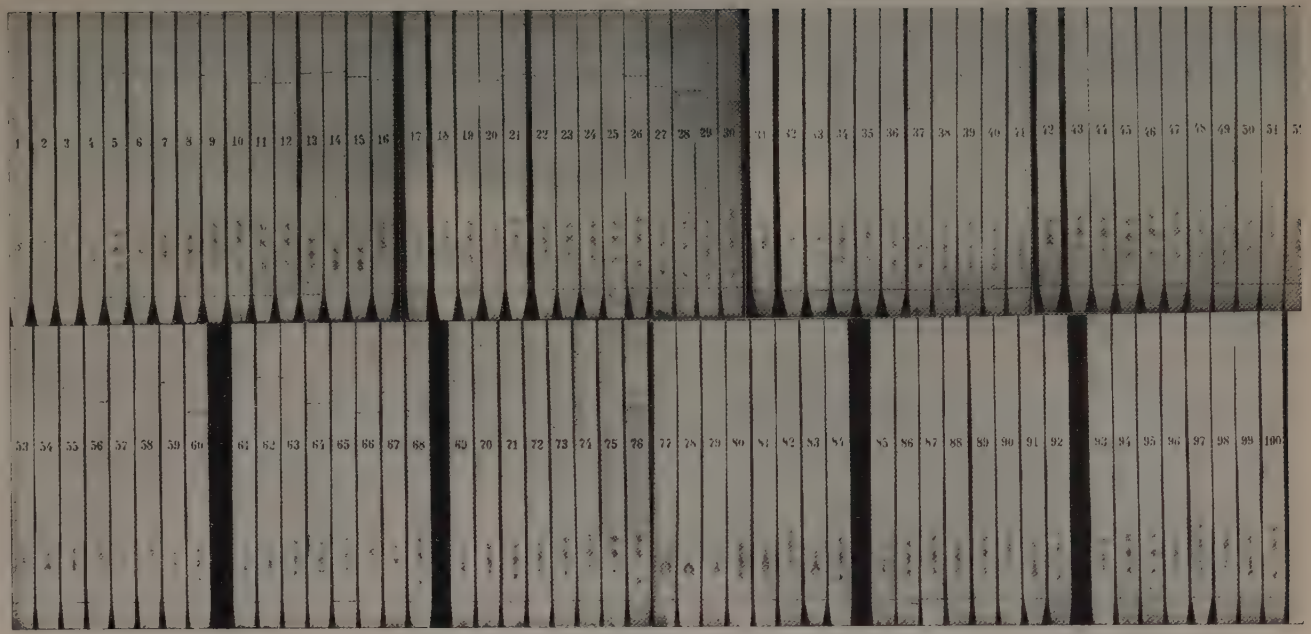


Abb. 1 und 2. Papierchromatogramme verschiedener Vitamin-B_{12}-Arten
Vgl. dazu die Tabellen 2 bis 7. Erklärung im Text

Papierchromatographie von B_{12}-Vitaminen unter Verwendung verschiedener Salze im Entwickler

Abb. 2

Die Papierchromatographie wurde wie bereits beschrieben[1] durchgeführt. Entwickler: wassergesättigtes sek. Butanol mit 1 ml 10%iger wäßriger Blausäure in 1 l, mit verschiedenen Salzen. Temperatur etwa 21 bis 23°. Entwicklungsdauer: 18 Stunden (falls nichts anderes bemerkt). Entwicklung: aufsteigend.

Die papierchromatographischen Versuche bestätigten im allgemeinen die säulenchromatographischen Ergebnisse mit der Ausnahme, daß sich hier z. B. Kaliumbromat und dibromessigsaures Natrium nicht gut bewährten. Tabelle 2 enthält Salze, die eine gute Trennung von Vitamin B_{12}, Vitamin-B_{12}-Faktor III[4] und Pseudovitamin B_{12} ergaben (vgl. auch Papierchromatogramme Nr. 1 bis 16, Abb. 1). Am besten bewährten sich Kalium- bzw. Natriumperchlorat, Natriumtrichloracetat, Natriumtetraphenyloborat und camphersulfonsaures Natrium. Sie verursachen eine besonders hohe Dispersion und eine ausgezeichnete Trennschärfe der Flecke. Natriumdichloracetat bewährte sich fast so gut wie Natriumtrichloracetat, weniger das Monochloracetat, desgleichen Chlorate und Nitrate. Kaliumchlorid, Kaliummhydrogenphosphat und Natriumsulfat minderten nur stark die Wanderungsgeschwindigkeit der B_{12}-Arten, ohne jedoch die Dispersion zu erhöhen.

Einfluß der Konzentration chromatotroper Salze auf den Verlauf der Papierchromatographie

Mit steigender Konzentration chromatotroper Salze wird im allgemeinen die Dispersion erhöht (vgl. Tabelle 3 sowie Papierchromatogramme

Tabelle 3. Papierchromatographische Trennung verschiedener Vitamine der B_{12}-Gruppe unter Verwendung steigender Konzentrationen chromatotroper Salze im Entwickler

Nr.	Salz	Salzkonz. im Entwickler		R_f-Wert der B_{12}-Faktoren			Dispersion mm
		g in 100 ml	Mole pro l	Vit. B_{12}	Faktor III	ψ-Vit. B_{12}	
17	ohne	—	—	0,29	0,23	0,19	21,5
18	$KClO_4$	$^1/_8$ gesättigt	—	0,31	0,24	0,17	33,5
19		$^1/_4$ gesättigt	—	0,31	0,24	0,15	37,5
20		$^1/_2$ gesättigt	0,005	0,33	0,26	0,16	40,5
21		gesättigt	0,01	0,32	0,25	0,15	40,0
22	Na-Tetraphenyloborat	0,22	0,0003	0,29	0,23	0,18	26,5
23		0,043	0,0006	0,31	0,24	0,17	31,5
24		0,086	0,00125	0,29	0,22	0,14	35,0
25		0,171	0,0025	0,30	0,24	0,14	38,5
26		0,342	0,005	0,32	0,24	0,11	48,0
27		0,72	0,01	0,31	0,22	0,08	49,5
28		1,44	0,022	0,33	0,21	0,07	55,0
29		2,87	0,044	0,33	0,19	0,06	59,5
30		5,7	0,088	0,39	0,24	0,07	65,0
31	ohne	—	—	0,29	0,23	0,19	22,0
32	Camphersulfonsaures Na	0,034	0,00125	0,31	0,24	0,17	31,5
33		0,068	0,0025	0,31	0,24	0,16	34,0
34		0,136	0,005	0,31	0,24	0,15	35,0

Papierchromatographische Trennung verschiedener Vitamine der B_{12}-Gruppe unter Verwendung steigender Konzentrationen chromatotroper Salze im Entwickler

Fortsetzung von Tabelle 3.

Nr.	Salz	Salzkonz. im Entwickler		R_f-Werte der B_{12}-Faktoren			Dispersion mm
		g in 100 ml	Mole pro l	Vit. B_{12}	Faktor III	ψ-Vit. B_{12}	
35	Camphersulfonsaures Na	0,272	0,01	0,32	0,25	0,15	40,0
36		0,544	0,02	0,30	0,22	0,12	39,5
37		0,78	0,03	0,30	0,21	0,12	39,5
38		1,56	0,06	0,31	0,21	0,11	44,0
39		3,125	0,12	0,33	0,22	0,12	55,9
40		6,25	0,23	0,30	0,20	0,10	40,0
41		12,5	0,46	0,30	0,19	0,10	39,0
42	ohne	—	—	0,30	0,23	0,20	23,0
43	Trichloressigsaures Na	0,023	0,00125	0,32	0,25	0,18	31,0
44		0,046	0,0025	0,31	0,25	0,17	34,0
45		0,009	0,005	0,30	0,23	0,14	36,0
46		0,185	0,01	0,32	0,24	0,14	41,0
47		0,37	0,02	0,34	0,25	0,13	45,0
48		0,74	0,04	0,34	0,25	0,15	44,0
49		1,48	0,08	0,37	0,27	0,15	49,0
50		2,96	0,16	0,40	0,30	0,18	51,0
51		5,92	0,32	0,50	0,39	0,25	54,0
52		11,84	0,64	0,45	0,32	0,20	51,0

Nr. 17 bis 52 und 134 bis 141, Abb. 1 u. 2). Dies ist beim Kaliumperchlorat weniger deutlich, da es infolge seiner Schwerlöslichkeit nur eine recht geringe Konzentration im Entwickler erreichen kann (Papierchromatogramme Nr. 17 bis 21). Die Erhöhung der Dispersion mit der Salzkonzentration ist deutlicher beim Natriumsalz der Campher-sulfonsäure (Papierchromatogramme 31 bis 41), noch deutlicher bei Natriumtrichloracetat (Papierchromatogramme Nr. 42 bis 52), am deutlichsten bei Natriumtetraphenyloborat (Papierchromatogramme Nr. 22 bis 30). Die erzielte Erhöhung der Dispersion gegenüber der Kontrolle ohne Salze (Papierchromatogramme Nr. 17, 31, 42) ist das Ergebnis zweier Effekte, nämlich der Verminderung der Wanderungsgeschwindigkeit vor allem der langsameren B_{12}-Arten, sowie der Beschleunigung des Laufes vor allem der schnelleren B_{12}-Arten. Je nachdem, welcher dieser Effekte überwiegt, werden die Flecke der B_{12}-Vitamine — verglichen mit der Kontrolle — nach unten oder nach oben verschoben.

Tabelle 4 und die Papierchromatogramme 134 bis 141 (Abb. 2) zeigen die Trennung von sechs Vitamin-B_{12}-Faktoren bei verschiedenen Konzentrationen an Natriumtetraphenyloborat im Entwickler. Wie zu ersehen

Tabelle 4

Papierchromatographische Trennung von sechs verschiedenen Vitamin-B_{12}-Faktoren bei verschiedenen Konzentrationen an Na-Tetraphenyloborat im Entwickler. Entwicklungsdauer: 23 Stunden. Reihenfolge der B_{12}-Faktoren in den Papierchromatogrammen der Abb. 2 (von oben nach unten): Faktor I, Faktor Ia^{18}, Vitamin B_{12}, Faktor III, Faktor A, ψ-Vitamin B_{12}.

Papierchromatogramm Nr.	134	135	136	137	138	139	140	141
Na-Tetraphenylo-borat ..... %	ohne	0,05	0,1	0,2	0,375	0,75	1,5	3,0

ist, eignen sich die mittleren Konzentrationen an Natriumtetraphenyloborat (0,1 bis 0,4%) am besten zur Trennung der B_{12}-Faktoren. Eine

Tabelle 5. Papierchromatographische Trennung von Faktor A und ψ-Vitamin B_{12} bei verschiedenen Konzentrationen an Perchloraten im Entwickler. Entwicklungsdauer: 76 Stunden

Nr.	Salz	Salzkonz. %	R_f-Wert von	
			Faktor A	ψ-Vit. B_{12}
142	$KClO_4$	gesättigt	0,24	0,18
143	$NaClO_4$	0,3	0,26	0,22
144	$NaClO_4$	1,0	0,21	0,17
145	$NaClO_4$	3,0	0,19	0,16

vollständige Trennung von Faktor A und Pseudovitamin B_{12} gelingt mit Kalium- bzw. Natriumperchlorat (Tabelle 5, Papierchromatogramme 142 bis 145 in Abb. 2).

Wie aus dem Papierchromatogramm 147 ersichtlich ist, lassen sich auch die Faktoren III und C in Gegenwart von 3% Na-Tetraphenyloborat im Entwickler vorzüglich trennen. Ohne Salzzusatz bleiben diese Faktoren ungetrennt (vgl. Papierchromatogramm 146 und Tabelle 6). Die Papierchromatogramme 148 und 149 zeigen, daß ein Zusatz von Na-Tetraphenyloborat zum Entwickler die Wanderung des Faktors V stark abbremst (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6. Papierchromatographische Trennung von einigen Vitamin-B_{12}-Faktoren mit bzw. ohne Na-Tetraphenyloborat. Entwicklungsdauer: 24 Stunden

Nr.	Salzkonz. %	R_f-Wert von			
		Vitamin B_{12}	Faktor III	Faktor C*	Faktor V
146	ohne	0,28	0,22	0,22	—
147	3	0,34	0,20	0,09	—
148	ohne	0,29	0,23	—	0,15
149	3	0,32	0,18	—	0,02

* Aus biosynthetischen Versuchen von Dr. *Hanswerner Dellweg* und Frau *Elisabeth Becher*.

Mit unbehandeltem Filterpapier und salzfreiem Entwickler werden der Faktor III und Pseudovitamin B_{12} nur sehr schlecht getrennt (Faktor A liegt stets dazwischen). Bei Benützung eines mit destilliertem Wasser oder mit völlig salzfreiem Entwickler vorgewaschenen Filterpapiers bleiben Faktor III und Pseudovitamin B_{12} völlig ungetrennt (vgl. Papierchromatogramm 125; oberer Fleck: Vitamin B_{12}, unterer: Faktor III + ψ-Vitamin B_{12}). Durch eingehende Versuche wurde festgestellt, daß eine Imprägnierung der Papierstreifen mit chromatotropen Salzen — gleich, ob die Imprägnierung durch Aufsteigenlassen der Salzlösung und darauf folgendes Trocknen oder durch Einlegen in Salzlösung und Trocknen erfolgt — zwecklos ist. So imprägnierte Streifen verhalten sich praktisch wie nicht vorbehandeltes Papier.

Beseitigung von Salzstörungen in der Papierchromatographie durch chromatotrope Salze

Vitamin-B_{12}-Gemische, die größere Mengen nicht chromatotroper Salze enthalten, lassen sich papierchromatographisch nicht trennen. Während der Entwicklung mit salzfreiem Entwickler wird der Vitamin-B_{12}-Fleck verwischt, so daß keine Trennung möglich ist. Stark salzhaltige Vitamin-B_{12}-Gemische sind aber papierchromatographisch gut trennbar, wenn dem Entwickler (sek. Butanol-Wasser) gewisse chromatotrope Salze in genügend hohen Konzentrationen beigefügt werden.

Tabelle 7. Papierchromatographische Trennung von Vitamin B_{12}, Faktor III und ψ-Vitamin B_{12} in Gegenwart störender Salze mit verschiedenen chromatotropen Salzen im Entwickler.

Chromatotropes Salz		$(NH_4)_2SO_4$				K_2HPO_4				NaCl			
Formel	%[a]	Nr.	%[b]	Flecke Zahl	Flecke Trennung	Zahl	%[b]	Flecke Nr.	Flecke Trennung	Nr.	%[b]	Flecke Zahl	Flecke Trennung
ohne	—	53	18,8	1	diffus	77	15,9	1	diffus	101	9,0	1	diffus
$KClO_4$	gesättigt	54	18,8	1	diffus	78	15,9	1	diffus	102	9,0	1	diffus
Camphersulfonsaures Na	0,54	55	18,8	2		79	15,9	2	diffus	103	9,0	1	diffus
	6,25	56	18,8	3	gut	80	15,9	3		104	9,0	3	diffus
$Cl_3C \cdot CO_2Na$	0,37	57	18,8	1	diffus	81	15,9	1	diffus	105	9,0	1	diffus
$Cl_3C \cdot CO_2Na$	5,92	58	18,8	3	gut	82	15,9	3	gut	106	9,0	1	diffus[c]
Na-Tetraphenylo-borat	0,342	59	18,8	2		83	15,9	1	diffus	107	9,0	1	diffus
	2,87	60	18,8	3	sehr gut	84	15,9	3	sehr gut	108	9,0	3	
ohne	—	61	7,54	2		85	8,0	2		109	3,6	1	diffus
$KClO_4$	gesättigt	62	7,54	2		86	8,0	3	gut	110	3,6	1	diffus
Camphersulfonsaures Na	0,54	63	7,54	3	gut	87	8,0	3	gut	111	3,6	1	diffus[c]
	6,25	64	7,54	3	gut	88	8,0	3		112	3,6	3	gut
$Cl_3C \cdot CO_2Na$	0,37	65	7,54	2		89	8,0	3	sehr gut	113	3,6	3	diffus
$Cl_3C \cdot CO_2Na$	5,92	66	7,54	3	gut	90	8,0	3		114	3,6	3	
Na-Tetraphenylo-borat	0,342	67	7,54	3	sehr gut	91	8,0	2		115	3,6	1	diffus[c]
	2,87	68	7,54	3	sehr gut	92	8,0	3	sehr gut	116	3,6	4	[d]
ohne	—	69	3,77	2		93	4,0	3		117	1,8	2	diffus
$KClO_4$	gesättigt	70	3,77	3		94	4,0	3	sehr gut	118	1,8	3	diffus
Camphersulfonsaures Na	0,54	71	3,77	3	sehr gut	95	4,0	3	sehr gut	119	1,8	3	gut
	6,25	72	3,77	3	gut	96	4,0	3		120	1,8	3	gut
$Cl_3C \cdot CO_2Na$	0,37	73	3,77	3	sehr gut	97	4,0	3	sehr gut	121	1,8	2	
$Cl_3C \cdot CO_2Na$	5,92	74	3,77	3	gut	98	4,0	3		122	1,8	3	gut
Na-Tetraphenylo-borat	0,342	75	3,77	3	sehr gut	99	4,0	3		123	1,8	3	
	2,87	76	3,77	3	sehr gut	100	4,0	3	sehr gut	124	1,8	3	gut

[a] Konzentration im Entwickler. — [b] Konzentration in der B_{12}-Lösung. — [c] Flecke langgezogen, ineinander übergehend. — [d] Pseudovitamin B_{12} gab in diesem Fall 2 Flecke.

Zur Demonstrierung von Salzstörungen und deren Beseitigung wurden auf die getrockneten Flecke der Vitamin-B_{12}-Gemische auf Filterpapierstreifen Salzlösungen (enthaltend jeweils ca. 0,003 ml einer wäßrigen Lösung der störenden Salze) aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden die Streifen mit salzfreien bzw. salzhaltigen sek. Butanol-Wasser-Gemischen entwickelt. Die zur Beseitigung von Salzstörungen verwendeten chromatotropen Salze wurden jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen im Entwickler verwendet. Die niedrigere Konzentration war optimal für salzfreie Proben der B_{12}-Vitamine. Die höhere Konzentration stellt die obere Grenze für die papierchromatographische Trennbarkeit salzfreier Proben der B_{12}-Vitamine vor.

Aus der Tabelle 7 und den Papierchromatogrammen 53 bis 124 der Abb. 1 und 2 ist folgendes zu entnehmen:

Gemische der B_{12}-Vitamine, die in ihren wäßrigen Lösungen mehr als 4% Ammoniumsulfat oder mehr als 8% Kaliumhydrogenphosphat oder mehr als 1% Natriumchlorid enthalten, lassen sich unter den üblichen Bedingungen papierchromatographisch nicht trennen.

Vitamin-B_{12}-Gemische, die in ihren wäßrigen Lösungen bis gegen 20% Ammoniumsulfat oder bis 16% Kaliumhydrogenphosphat enthalten, lassen sich papierchromatographisch mit hoher Dispersion und sehr guter Schärfe trennen, wenn der Entwickler etwa 6% camphersulfonsaures Natrium oder etwa 6% trichloressigsaures Natrium oder etwa 3% Natriumtetraphenyloborat enthält (im letzten Fall ist die Trennung am besten). Bei niedrigeren Konzentrationen an Ammoniumsulfat bzw. Kaliumhydrogenphosphat in der zu chromatographierenden Lösung genügt eine geringere Konzentration an chromatotropen Salzen im Entwickler.

Vitamin-B_{12}-Gemische, die in ihrer wäßrigen Lösung bis etwa 9% Natriumchlorid enthalten, lassen sich papierchromatographisch trennen, wenn der Entwickler ca. 3% Natriumtetraphenyloborat enthält. Wenn in der zu chromatographierenden Lösung weniger als 4% Natriumchlorid vorhanden sind, ist eine Trennung möglich, wenn der Entwickler etwa 6% camphersulfonsaures Natrium oder etwa 6% trichloressigsaures Natrium oder etwa 3% Natriumtetraphenyloborat enthält.

Diffusion von B_{12}-Vitaminen durch eine halbdurchlässige Zellulosemembran in Gegenwart chromatotroper Salze

Als Diffusionskammern dienten unten geschlossene Glasrohre (Durchmesser: 2 cm, Höhe: 7 cm), in die Glasrohre (Durchmesser: 1,3 cm) eingesetzt wurden, die unten mit einer Zellulosemembran (Cellophan-Dialysierschlauch der Firma Kalle & Co., A. G., Wiesbaden-Biebrich) verschlossen waren. Beide Gefäße wurden mit einer Lösung des chromatotropen Salzes in cyanidhaltigem, wassergesättigtem sek. Butanol bis zum gleichem Niveau gefüllt. Im Medium des äußeren Gefäßes war außerdem ein Vitamin-B_{12}-Faktor in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gelöst. Die Proben wurden im Dunkeln unter zeitweisem Rühren 48 Stunden stehengelassen. Sodann wurde der Gehalt an B_{12}-Faktor im inneren Gefäß mittels des Beckman-DU-Spektrophotometers gemessen (siehe Abb. 3 und 4).

Abb. 2 zeigt, daß die Diffusionsgeschwindigkeit des B_{12}-Faktors III in wassergesättigtem sek. Butanol durch camphersulfonsaures Natrium abhängig von dessen Konzentration beträchtlich beeinflußt wird. Das gleiche gilt für die Wirkung von Kaliumperchlorat auf Vitamin B_{12} (Abb. 4). In beiden Fällen verursachen sehr niedrige Salzkonzentrationen eine Beschleunigung und höhere eine Verlangsamung der Diffusionsgeschwindigkeit. In der Papierchromatographie beobachteten wir oft in denselben Konzentrationsbereichen der betreffenden Salze eine gleichartige Beschleunigung bzw. Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit (vgl. Papierchromatogramme 31 bis 41). Abb. 5 zeigt die R_f-Werte von drei Vitamin-B_{12}-Arten abhängig von der Konzentration an camphersulfonsaurem Natrium. Diese Ergebnisse stützen unsere Annahme, daß in der Zellulose säure sowie im Papierchromatogramm osmotische Vorgänge stattfinden, die durch Salze weitgehend beeinflußt werden. Die Verteilungsvorgänge im Papierstreifen und die Diffusionsvorgänge beiderseits einer halbdurchlässigen Membran sind daher offenbar ganz eng miteinander verwandt. Wir beabsichtigen, die Diffusionsversuche auf weitere Vitamine der B_{12}-Gruppe sowie auf weitere chromatotrope Salze auszudehnen.

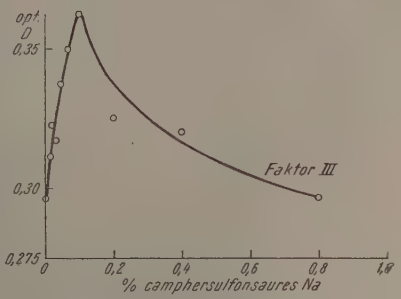


Abb. 3. Diffusionsversuche mit B_{12}-Faktor III in wassergesättigtem sek. Butanol mit verschiedenen Konzentrationen an camphersulfonsaurem Natrium

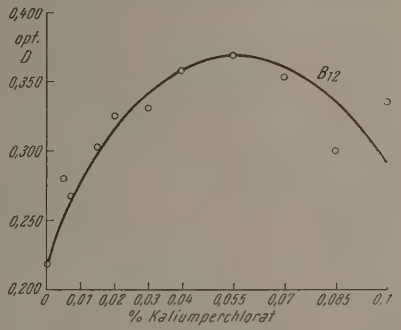


Abb. 4. Diffusionsversuche mit Vitamin B_{12} im gleichen Medium wie in Abb. 1 mit verschiedenen Konzentrationen an Kaliumperchlorat

Diskussion

Untersuchungen über die Vitamine der B_{12}-Gruppe werden dadurch erschwert, daß es sich um sehr ähnliche Verbindungen handelt. Die z. T. minimalen Unterschiede in ihrem strukturellen Aufbau wirken sich bei dem hohen Molekulargewicht nur wenig aus. Für die Prüfung der biologischen Eigenschaften ist aber die Anwendung völlig einheitlicher Individuen entscheidend. Solange geeignete Methoden fehlten, gelangte

man daher häufig zu mancherlei Irrtümern hinsichtlich der Einheitlichkeit einer Vitamin-B_{12}-Art und manche zunächst berichteten biologischen Wirkungen neuer B_{12}-Faktoren hielten einer Überprüfung mit völlig einheitlichen Substanzen nicht stand.

Die Papierchromatographie erwies sich in der üblichen Ausführungs-

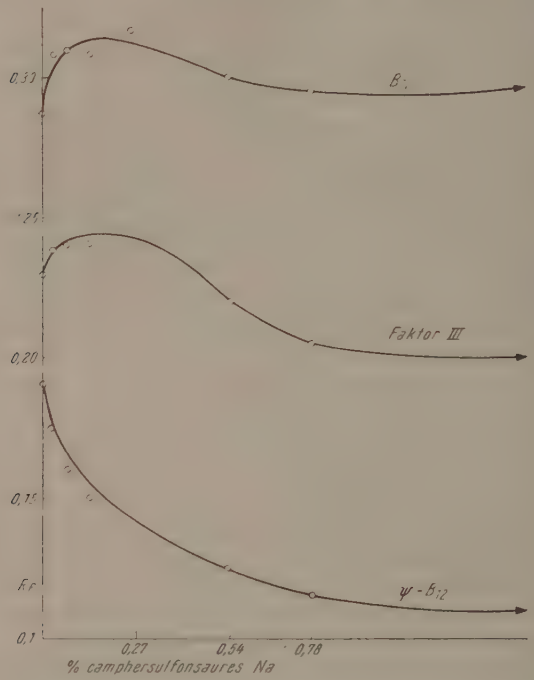


Abb. 5. R_f-Werte von drei Vitamin-B_{12}-Arten im Papierchromatogramm mit verschiedenen Konzentrationen an camphersulfonsaurem Natrium in wassergesättigtem sek. Butanol als Entwickler

form als nicht genug zuverlässig, um eine Entscheidung über die Einheitlichkeit einer B_{12}-Art fällen zu können. Ebensowenig ist die Papierelektrophorese allein imstande, die Einheitlichkeit eines B_{12}-Faktors sicherzustellen, da es mehrere Vitamin-B_{12}-Arten gibt, die sich elektrophoretisch gleich verhalten. Erst die Kombination der Papierchromatographie mit der Papierelektrophorese brachte einen entscheidenden Fortschritt[5].

In der vorliegenden Untersuchung wird die chromatographische Methode zur Zerlegung von B_{12}-Gemischen soweit vervollkommnet, daß sie in der beschriebenen Form eine zuverlässige Trennung ge-

stattet und den Nachweis der Einheitlichkeit eines B_{12}-Faktors ermöglicht.

Es zeigte sich nämlich, daß die Trennung von Vitamin-B_{12}-Arten in der Zellulosesäule und im Papierchromatogramm durch die Anwesenheit von Salzen weitgehend beeinflußt wird. Wenn man Filterpapier vor der Chromatographie durch Waschen mit destilliertem Wasser bzw. mit völlig salzfreiem Entwickler von den üblicherweise vorhandenen Salzspuren befreit, dann lassen sich gewisse B_{12}-Vitamine, nämlich Faktor III, Faktor A und Pseudovitamin B_{12}, überhaupt nicht trennen, sie wandern gemeinsam. Fast ebenso verhalten sich die B_{12}-Faktoren III und C. Daraus ergibt sich, daß ein gewisser Ionengehalt für die Trennung unerläßlich ist.

Je nach der Art der anwesenden Salze wird aber die Trennung entweder in positivem oder in negativem Sinn beeinflußt, so daß man von chromatotropen und nicht-chromatotropen Salzen sprechen kann. Die Wirkung der chromatotropen Salze besteht darin, daß sie die Wanderung der B_{12}-Arten in verschiedenem Sinn beeinflussen, indem nämlich die rasch wandernden B_{12}-Arten (Faktor I, Ia und Vitamin B_{12}) im allgemeinen beschleunigt, die langsamen (Faktor III, Faktor A, Pseudovitamin B_{12} Faktor C und die Faktoren V) gebremst werden. Das Ergebnis der unterschiedlichen Beschleunigung bzw. Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen B_{12}-Faktoren ist deren erhöhte Dispersion und damit bessere Trennung. Dies wirkt sich besonders bei den langsam wandernden Faktoren aus, die ohne chromatotrope Salze fast ganz beisammen bleiben, in deren Gegenwart aber gut getrennt werden. Faktor A und Pseudovitamin B_{12}, die sich nur durch eine Methylgruppe voneinander unterscheiden und deren Trennung bisher nur elektrophoretisch möglich war[6], können nunmehr auch papier- und säulenchromatographisch zerlegt werden.

Bei dieser vervollkommneten chromatographischen Methode bewährte sich im Papierchromatogramm nur die Beimischung der chromatotropen Salze zum Entwickler. *Wijmenga*[7] versuchte zwar, die Trennung von Vitaminen der B_{12}-Gruppe dadurch zu verbessern, daß er die Papierstreifen mit 0,66-n KH_2PO_4 imprägnierte, um so die im System n-Butanol-Wasser sehr niedrigen R_f-Werte zu erhöhen, doch blieb der Effekt fraglich. Nach unseren Beobachtungen gehören übrigens Phosphate zu den nicht-chromatotropen Salzen und ihre Anwesenheit im Papierchromatogramm wirkt störend. Aber auch die Imprägnierung der Papierstreifen mit chromatotropen Salzen erwies sich als ungeeignet, da sie mit dem Entwickler rasch abwandern, wodurch ihre Wirkung verlorengeht. Wohl aber können in der Säulenchromatographie chromatotrope Salze mit dem Kieselgurpräparat vermengt und so in die Säule eingeführt werden[1]. Die mit dem Entwickler wandernden Salze verteilen sich im Papier-

streifen sowie in der Chromatographiersäule gleichmäßig. Wenn der Entwickler z. B. Natriumtetraphenyloborat enthält, dann besitzt der entwickelte Papierstreifen überall die gleiche Menge an Salz.

Der Wirkungsmechanismus der chromatotropen Salze konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Auffallend ist aber die Auffindung einer gewissen Parallele zwischen der Wirkung bestimmter Konzentrationen an chromatotropen Salzen einerseits auf die Geschwindigkeit der Diffusion von Vitamin-B_{12}-Arten durch eine semipermeable Zellulosemembran und andererseits auf deren Wanderungsgeschwindigkeit im Papierchromatogramm. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Zellulosesäule bzw. das Filterpapier bei der Chromatographie wie halbdurchlässige Membranen wirken, indem sie die mit dem Entwickler wandernden B_{12}-Arten mit verschiedener Geschwindigkeit diffundieren lassen.

Einen weiteren Beitrag zur Erklärung der Wirkung chromatotroper Salze bietet die Vorstellung, daß die chromatotropen Anionen mit den B_{12}-Vitaminen Komplexe bzw. Aggregate bilden (zum Grundsätzlichen vgl.[2, 8]) oder daß sie das Adsorptionsmittel (Zellulose) verändern. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Beobachtung von *Waldron-Edward*[9] verwiesen, daß bei der Papierchromatographie gewisser Aminoverbindungen bereits 5 bis 50 μg Sulfat im Fleck eine starke Verminderung des R_f-Wertes verursachen kann. Der Verfasser führt diesen Effekt auf eine Salzbildung zurück, da beim Zusatz einer sehr kleinen Menge Natriumsulfat zwei Flecke im Papierchromatogramm erscheinen, einer mit normalem und ein anderer mit niedrigerem R_f-Wert (Na-Salz). Ferner beobachteten *Ericson* u. a.[10] bei der Papierelektrophorese von Vitamin-B_{12}-Präparaten das Auftreten eines anodisch wandernden Fleckes und suchten dessen Verhalten dadurch zu erklären, daß es sich dabei um einen Komplex zwischen dem Phosphatpuffer und Cobalamin handle.

Ferner könnte versucht werden, die Beobachtungen über die „Aussalzungs-Adsorption" bzw. „Aussalzungschromatographie" (salting out adsorption, salting out chromatography) zur Erklärung unserer Befunde über die Wirkung der chromatotropen Salze heranzuziehen. So fand *Tiselius*, daß viele Proteine und Farbstoffe in Gegenwart von Salzen (z. B. Ammoniumsulfat) besser adsorbierbar sind (z. B. an Silicagel oder Filterpapier) als ohne Salze[11, 12]. Weiter fanden *Hagdahl* und *Tiselius*[13], daß Aminosäuren und Peptide sich an Kohle und Filterpapier ähnlich verhalten und daß nach dem Aussalzungsprinzip ganz zufriedenstellende Papierchromatogramme erhalten werden, wenn als Entwickler starke (1- bis 2-molare) Phosphatpuffer verwendet werden. In Abwesenheit von Salzen findet praktisch keine Adsorption statt. Papierchromatographische Trennungen von Proteinen mit Hilfe von Salzkonzentrationsgradienten wurden von *Legge*[14] ausgeführt. Die dabei beobachteten Effekte beruhen meist darauf, daß die Ionen gewisser Salze, wie z. B. Ammoniumsulfat, Na-

triumchlorid und Natriumsulfat, Wassermoleküle adsorbieren und auf diese Weise eine relative Verringerung der Wasserkonzentration bewirken. Ein Zusatz solcher Salze vermindert im allgemeinen auch die Löslichkeit organischer Lösungsmittel in Wasser[15]. Derartige Salze sind aber nach unseren Beobachtungen nicht chromatotrop und eignen sich nicht für unsere Zwecke. In unserem Fall könnte die Annahme, daß chromatotrope Ionen Wasser anlagern und so die wirksame Wasserkonzentration des Lösungsmittels verringern, vielleicht für höhere Salzkonzentrationen zutreffen, nicht aber für Konzentrationen der Größenordnung von 0,05%, bei denen bereits ein Bremseffekt auftritt (wie sich z. B. bei der Wirkung von Kaliumperchlorat auf Pseudovitamin B_{12} zeigt). Andererseits bewirkt z. B. Natriumtrichloracetat bis zu relativ hohen Salzkonzentrationen (6%) eine Erhöhung der R_f-Werte von Vitamin B_{12} und Faktor III. Außerdem werden durch die Anionen der lösungsvermittelnden Salze auch die Moleküle des organischen Lösungsmittels angelagert, so daß es in diesem Fall nicht ohne weiteres zu einer Verringerung der wirksamen Wasserkonzentration kommen kann.

Zur weiteren Abgrenzung unserer Befunde von der „Aussalzungs-Adsorption" bzw. „Aussalzungschromatographie" sei darauf hingewiesen, daß es sich bei den letztgenannten Effekten nur um eine Verlangsamung der Wanderung handelt. Beschleunigende Salzwirkungen, wie sie bei unserer Methode vorkommen, und die deren wesentliches Trennprinzip sind, wurden mit der Aussalzungs-Methodik niemals erzielt.

Durch nicht-chromatotrope Salze wird die chromatographische Auftrennung von Gemischen der B_{12}-Arten sehr gestört, da sie ein Ineinanderfließen der Zonen bzw. Flecke verursachen. Derartige Salze sind aber häufig in den zu chromatographierenden Proben enthalten. Dies gilt natürlich nicht nur für B_{12}-haltige Proben, sondern ganz allgemein. Diese Effekte werden auf die Aussalzung des organischen Lösungsmittels aus der mobilen Phase zurückgeführt. So beobachteten *Consden* u. a.[16] sowie *Partridge*[17], daß große Mengen salzartiger Verunreinigungen die Papierchromatographie stören, und empfahlen, die betreffenden Proben vorher mit Hilfe von Ionenaustauschern zu entsalzen. Es erweist sich daher als sehr nutzbringend, daß nach unseren Untersuchungen durch den Zusatz gewisser chromatotroper Salze zum Entwickler solche Salzstörungen in der Papierchromatographie der Vitamine der B_{12}-Gruppe völlig oder weitestgehend beseitigt werden können. Wenn es sich nur um analytische Aufgaben handelt, ist diese Maßnahme weitaus einfacher als die zeitraubende und verlustreiche Entsalzung mit Ionenaustauschern. Diese Methode könnte auch bei der Papierchromatographie anderer Stoffgemische von Nutzen sein.

Dieser Effekt der angeführten chromatotropen Salze ist wohl in der Weise zu erklären, daß sie gute Lösungsvermittler sind. Wenn man sehr

kleine Mengen dieser Salze einem zweiphasigen Gemisch von Wasser und sek. Butanol beimengt, verschwindet die Phasengrenze, das heißt, die beiden Phasen sind dann völlig miteinander mischbar. Die Beseitigung der Salzstörungen durch solche chromatotrope Salze ist so zu erklären, daß die Aussalzung von Wasser im Chromatogramm an Stellen, wo störende Salze in höheren Konzentrationen auftreten, völlig verhindert wird. Die lösungsvermittelnde Eigenschaft dieser chromatotropen Anionen beruht darauf, daß sie als Ionen hydrophil sind und gleichzeitig Gruppen besitzen, die ihnen eine beträchtliche Affinität zu organischen Lösungsmitteln verleihen. So lagern sich die Anionen an der Butanol-Wasser-Phasengrenze an, wodurch sich die beiden Phasen ineinander lösen. Nicht alle chromatotropen Salze sind Lösungsvermittler, so fehlt z. B. den Nitraten, Chloraten und Bromaten diese Eigenschaft. Es ist auffallend, daß unter den chromatotropen Salzen diejenigen für die Chromatographie der B_{12}-Vitamine am geeignetsten sind, also eine hohe Dispersion verursachen, die gleichzeitig gute Lösungsvermittler sind.

Für die freundliche Überlassung von krist. Pseudovitamin B_{12} haben wir Herrn Dr. *Jos. J. Pfiffner* (Parke, Davis & C., USA) und von krist. B_{12}-Faktor A Herrn Dr. *E. Lester Smith* (Glaxo Laboratories, England) bestens zu danken, für die technische Mitarbeit Fräulein *R. Eitel*.

Zusammenfassung

Die Trennung von Vitaminen der B_{12}-Gruppe in der Zellulosepulver-Säule sowie im Papierchromatogramm ist besonders erfolgreich, wenn das als Entwickler benutzte Gemisch von sek. Butanol und Wasser in kleinen Mengen „chromatotrope" Salze enthält. Als solche wirken die Natrium- und Kaliumsalze starker einbasischer, mehratomiger Säuren. Besonders bewährten sich Natriumtetraphenyloborat, camphersulfonsaures Natrium, Kalium- und Natriumperchlorat sowie trichloressigsaures Natrium.

Bei Verwendung höherer Konzentrationen der zuletzt genannten chromatotropen Salze im Entwickler können Gemische von Vitamin-B_{12}-Arten, die durch störende Salze verunreinigt sind und sich dadurch papierchromatographisch nicht trennen lassen, gut in die einzelnen Bestandteile zerlegt werden. Dieser Effekt kann durch die lösungsvermittelnde Eigenschaft dieser Salze erklärt werden.

Die Zellulosesäule bzw. das Filterpapier verhalten sich in Gegenwart des Entwicklers und der chromatotropen Salze ähnlich wie eine halbdurchlässige Membran aus Zellulose (Zellulosehydratfolie).

Summary

The separation of vitamins of the B_{12} group in the cellulose powder column as well as in the paper chromatogram is particularly successful if the mixture of sec. butanol and water used as developer contains small amounts of "chromatotropic" salts. The sodium and potassium salts of monobasic polyatomic acids serve this purpose. Especially recommended are: sodium

tetraphenyl borate, sodium camphorsulfonate, potassium and sodium perchlorate, and sodium trichloroacetate.

If higher concentrations of the latter named chromatotropic salts are used in the developer, mixtures of vitamin B_{12}-species, which are contaminated with interfering salts and which cannot be separated by paper chromatography, can be effectively resolved into the individual constituents. These effects can be explained by the solubilizing characteristic of these salts.

In the presence of the developer and the chromatotropic salts the cellulose column or the filter paper behave similar to a semipermeable membrane of cellulose (cellulose hydrate film).

Résumé

On obtient une excellente séparation des vitamines du groupe B_{12} par chromatographie sur colonne de poudre de cellulose ou sur papier lorsque le mélange de butanol secondaire et d'eau employé pour le développement contient de faibles quantités de sels «chromatotropiques». Ces derniers sont des sels sodiques ou potassiques d'acides polyatomiques monobasiques forts.

Le tétraphénylborate de sodium, la camphosulfonate de sodium, les perchlorates de potassium et de sodium, le trichloracétate de sodium sont particulièrement recommandables à cet égard.

L'emploi de hautes concentrations de ce dernier sel chromatotropique dans le développant permet de bien isoler les constituants des mélanges de certaines vitamines B_{12} qui contiennent des impuretés salines interdisant leur séparation par chromatographie sur papier. Cet effet peut être expliqué par les propriétés que confèrent ces sels à leurs solutions. Les colonnes de cellulose ou le papier filtre se comportent en présence du développant et des sels chromatotropiques comme une membrane de cellulose semi perméable (film d'hydrate de cellulose).

Literatur

[1] *W. Friedrich* und *K. Bernhauer*, Z. Naturforsch. **10** b, 6 (1955).
[2] *R. Wolff*, Angew. Chem. **67**, 89 (1955).
[3] *W. Friedrich* und *K. Bernhauer*, Z. Naturforsch. **9 b**, 755 (1954).
[4] *W. Friedrich* und *K. Bernhauer*, Angew. Chem. **65**, 627 (1953).
[5] *J. E. Ford* und *S. H. Hutner*, Vitamins and Hormones. Vol. **13** (1955).
[6] *J. E. Ford, E. S. Holdsworth, S. K. Kon* und *J. W. G. Porter*, Nature **171**, 148 (1953).
[7] *H. G. Wijmenga*, Dissertation, Utrecht. 1951.
[8] *H. G. Cassidy*, Adsorption and Chromatography. New York: Interscience. 1951. S. 90.
[9] *D. M. Waldron-Edward*, Chem. and Ind. **1954**, 104.
[10] *L. E. Ericson, Z. G. Bánhidi* und *G. Gasparetto*, Acta Chem. Scand. **6**, 1130 (1952).
[11] Vgl. *E. Lederer* und *M. Lederer*, Chromatography. New York: Elsevier. 1953. S. 229.
[12] *A. Tiselius*, Ark. Kemi **26 B**, Nr. 1 (1948).
[13] *R. Hagdahl* und *A. Tiselius*, Nature **170**, 799 (1952).
[14] Vgl. Zitat 11, l. c. S. 232.
[15] Vgl. Zitat 8, l. c. S. 88 bis 89.
[16] *R. Consden, A. H. Gordon* und *A. J. P. Martin*, Biochemic. J. **38**, 224 (1944); **41**, 590 (1947).
[17] *S. M. Partridge*, Biochemic. J. **42**, 238 (1948).
[18] *W. Friedrich* und *K. Bernhauer*, Z. Naturforsch. **9 b**, 685 (1954).

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Innsbruck

Phasenkontrastmikroskopische Studien zum Kristallwachstum

Von

M. Brandstätter

Mit 9 Abbildungen

(Eingelangt am 4. Mai 1955)

Nach der klassischen Theorie für das Kristallwachstum, die von *Volmer*[1], *Kossel*[2] und *Stranski*[3] entwickelt wurde, erfolgt das Weiterwachsen auf einer bereits vorhandenen Kristallfläche in der Art, daß sich die Moleküle bzw. Atome schichtenweise übereinanderlegen (Abb. 1).

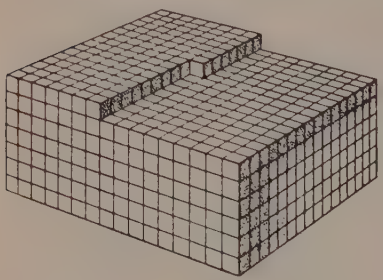


Abb. 1. Idealkristall

Zum Beginn einer neuen Schicht ist eine größere Übersättigung des Dampfes bzw. der Lösung notwendig als zum Auffüllen einer bereits begonnenen Schicht, da ein neuer Keim gebildet werden muß. Somit kann ein Kristall nur dann wachsen, wenn die für die Keimbildung erforderliche Übersättigung erreicht ist. Sie beträgt mindestens 25%. Entgegen dieser Voraussage gelang es *Volmer* und *Schultze*[4] 1931, Jodkristalle aus nur 1% übersättigtem Dampf weiterwachsen zu lassen. Diese ungewöhnlich große Diskrepanz zwischen Berechnung und Experiment gab Anlaß zu neuen Untersuchungen und 1949 gelang es *Frank*[5] in einem neuen Modell, das anstelle des schichtenweisen Wachsens mit immer neuer Keimbildung für jede Schicht kontinuierliches Wachsen in Form einer Spirale setzt, eine Erklärung dafür zu geben. *Frank* nimmt an, daß die Kristalle Schraubenversetzungen enthalten. Darunter versteht man einen besonderen Typ von Störungen im Kristallgitter, der zur

tetraphenyl borate, sodium camphorsulfonate, potassium and sodium perchlorate, and sodium trichloroacetate.

If higher concentrations of the latter named chromatotropic salts are used in the developer, mixtures of vitamin B_{12}-species, which are contaminated with interfering salts and which cannot be separated by paper chromatography, can be effectively resolved into the individual constituents. These effects can be explained by the solubilizing characteristic of these salts.

In the presence of the developer and the chromatotropic salts the cellulose column or the filter paper behave similar to a semipermeable membrane of cellulose (cellulose hydrate film).

Résumé

On obtient une excellente séparation des vitamines du groupe B_{12} par chromatographie sur colonne de poudre de cellulose ou sur papier lorsque le mélange de butanol secondaire et d'eau employé pour le développement contient de faibles quantités de sels «chromatotropiques». Ces derniers sont des sels sodiques ou potassiques d'acides polyatomiques monobasiques forts.

Le tétraphénylborate de sodium, la camphosulfonate de sodium, les perchlorates de potassium et de sodium, le trichloracétate de sodium sont particulièrement recommandables à cet égard.

L'emploi de hautes concentrations de ce dernier sel chromatotropique dans le développant permet de bien isoler les constituants des mélanges de certaines vitamines B_{12} qui contiennent des impuretés salines interdisant leur séparation par chromatographie sur papier. Cet effet peut être expliqué par les propriétés que confèrent ces sels à leurs solutions. Les colonnes de cellulose ou le papier filtre se comportent en présence du développant et des sels chromatotropiques comme une membrane de cellulose semi perméable (film d'hydrate de cellulose).

Literatur

[1] *W. Friedrich* und *K. Bernhauer*, Z. Naturforsch. **10** b, 6 (1955).
[2] *R. Wolff*, Angew. Chem. **67**, 89 (1955).
[3] *W. Friedrich* und *K. Bernhauer*, Z. Naturforsch. **9 b**, 755 (1954).
[4] *W. Friedrich* und *K. Bernhauer*, Angew. Chem. **65**, 627 (1953).
[5] *J. E. Ford* und *S. H. Hutner*, Vitamins and Hormones. Vol. **13** (1955).
[6] *J. E. Ford*, *E. S. Holdsworth*, *S. K. Kon* und *J. W. G. Porter*, Nature **171**, 148 (1953).
[7] *H. G. Wijmenga*, Dissertation, Utrecht. 1951.
[8] *H. G. Cassidy*, Adsorption and Chromatography. New York: Interscience. 1951. S. 90.
[9] *D. M. Waldron-Edward*, Chem. and Ind. **1954**, 104.
[10] *L. E. Ericson*, *Z. G. Bánhidi* und *G. Gasparetto*, Acta Chem. Scand. **6**, 1130 (1952).
[11] Vgl. *E. Lederer* und *M. Lederer*, Chromatography. New York: Elsevier. 1953. S. 229.
[12] *A. Tiselius*, Ark. Kemi **26 B**, Nr. 1 (1948).
[13] *R. Hagdahl* und *A. Tiselius*, Nature **170**, 799 (1952).
[14] Vgl. Zitat 11, l. c. S. 232.
[15] Vgl. Zitat 8, l. c. S. 88 bis 89.
[16] *R. Consden*, *A. H. Gordon* und *A. J. P. Martin*, Biochemic. J. **38**, 224 (1944); **41**, 590 (1947).
[17] *S. M. Partridge*, Biochemic. J. **42**, 238 (1948).
[18] *W. Friedrich* und *K. Bernhauer*, Z. Naturforsch. **9 b**, 685 (1954).

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Innsbruck

Phasenkontrastmikroskopische Studien zum Kristallwachstum

Von

M. Brandstätter

Mit 9 Abbildungen

(Eingelangt am 4. Mai 1955)

Nach der klassischen Theorie für das Kristallwachstum, die von *Volmer*[1], *Kossel*[2] und *Stranski*[3] entwickelt wurde, erfolgt das Weiterwachsen auf einer bereits vorhandenen Kristallfläche in der Art, daß sich die Moleküle bzw. Atome schichtenweise übereinanderlegen (Abb. 1).

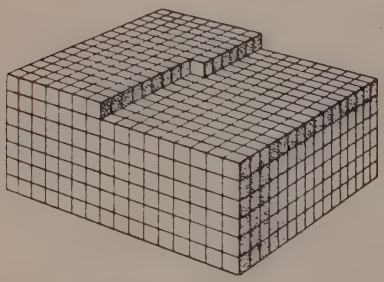


Abb. 1. Idealkristall

Zum Beginn einer neuen Schicht ist eine größere Übersättigung des Dampfes bzw. der Lösung notwendig als zum Auffüllen einer bereits begonnenen Schicht, da ein neuer Keim gebildet werden muß. Somit kann ein Kristall nur dann wachsen, wenn die für die Keimbildung erforderliche Übersättigung erreicht ist. Sie beträgt mindestens 25%. Entgegen dieser Voraussage gelang es *Volmer* und *Schultze*[4] 1931, Jodkristalle aus nur 1% übersättigtem Dampf weiterwachsen zu lassen. Diese ungewöhnlich große Diskrepanz zwischen Berechnung und Experiment gab Anlaß zu neuen Untersuchungen und 1949 gelang es *Frank*[5] in einem neuen Modell, das anstelle des schichtenweisen Wachsens mit immer neuer Keimbildung für jede Schicht kontinuierliches Wachsen in Form einer Spirale setzt, eine Erklärung dafür zu geben. *Frank* nimmt an, daß die Kristalle Schraubenversetzungen enthalten. Darunter versteht man einen besonderen Typ von Störungen im Kristallgitter, der zur

Stufenbildung an der Kristalloberfläche führt (Abb. 2). An einer derartigen offenen Stufe nun können sich die neuankommenden Moleküle festsetzen, ohne daß Keimbildung notwendig wäre. Das Weiterwachsen auf einer Schraubenversetzung führt zur Ausbildung eines spiraligen Wachstumshügels (Abb. 3).

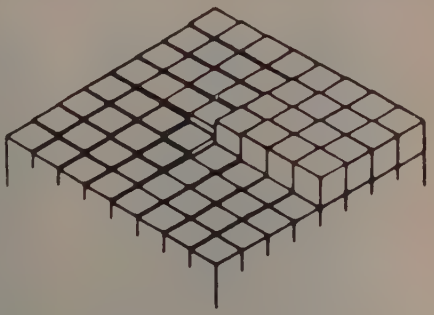
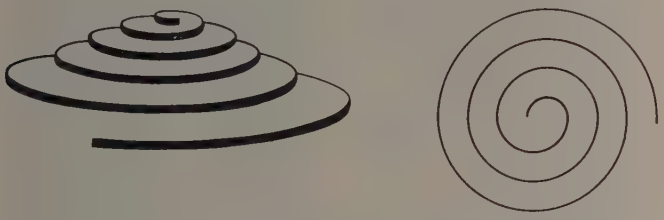


Abb. 2. Schraubenversetzung (nach *Frank*)

*Frank*s Vorstellungen fanden ihre Bestätigung durch die Auffindung von Wachstumsspiralen auf zahlreichen Kristallen verschiedenster Stoffe. Wir haben nun vor einigen Jahren in den organischen Verbindungen ein Material gefunden, das sich in besonderem Maße dazu eignet, die von *Frank* gemachten Voraussagen über das Spiralwachstum zu demonstrieren[6]. Organische Stoffe sind vielfach bei leicht zugänglichen Temperaturen zu verdampfen und sie bilden bei der Sublimation auf ein Deckglas bevorzugt Kristalle mit plattenartigem Habitus aus, die für das Studium des Spiralwachstums besonders geeignet sind. Die Ursache dafür, daß vorallem flächenhaft ausgebreitete Kristalle Spiralwachstum zeigen, sieht *Frank* darin, daß bei dünnen Kristallen, wenn sie eine bestimmte Größe überschrei-



a *b*

Abb. 3. Wachstumsspirale

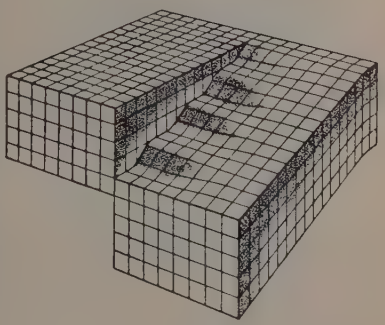


Abb. 4. Vierfache Schraubenversetzung (nach *Fullman*)

ten, Spannungen auftreten, die zur spontanen Bildung von Versetzungen führen.

Mikroskopisch sichtbare Spiralen sind nach *Frank* auf Versetzungen

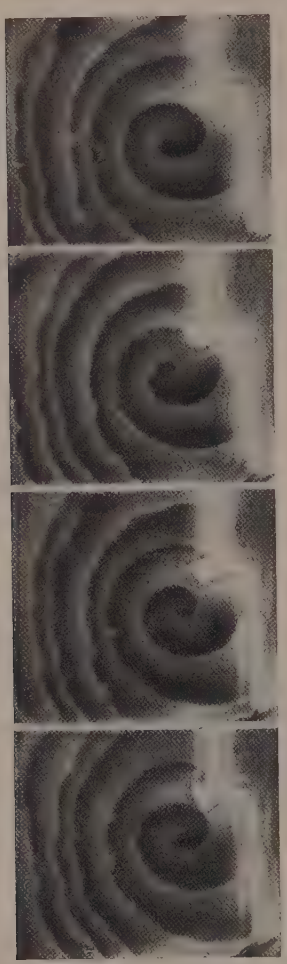


Abb. 5. Spirale auf Diphenylamin

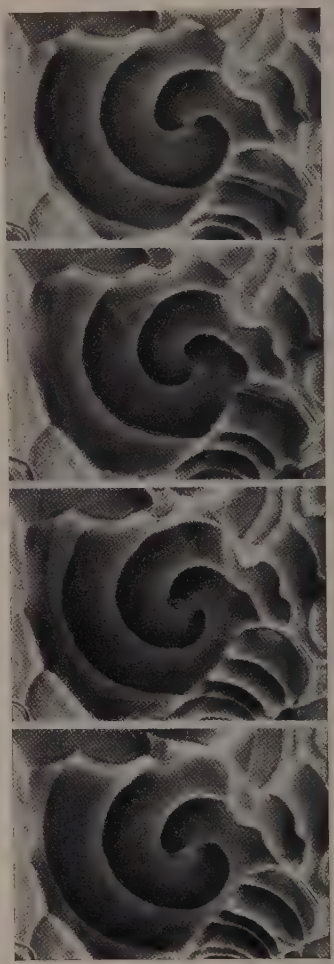


Abb. 6. Doppelspirale auf Phenanthren

von vielfacher Stärke gewachsen. Darunter sind Gruppen von Versetzungen zu verstehen, die sehr nahe beisammen sind und den gleichen Drehsinn besitzen. Abb. 4 zeigt eine vierschichtige Stufe, die von vier Ver-

Stufenbildung an der Kristalloberfläche führt (Abb. 2). An einer derartigen offenen Stufe nun können sich die neuankommenden Moleküle festsetzen, ohne daß Keimbildung notwendig wäre. Das Weiterwachsen auf einer Schraubenversetzung führt zur Ausbildung eines spiraligen Wachstumshügels (Abb. 3).

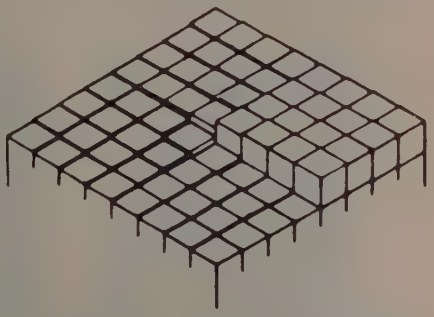
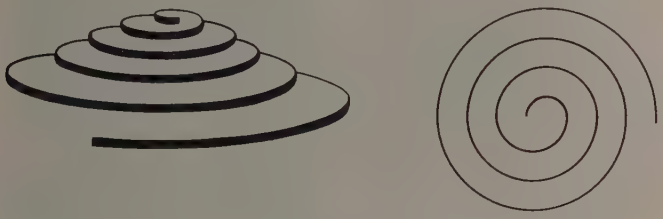


Abb. 2. Schraubenversetzung (nach *Frank*)

Franks Vorstellungen fanden ihre Bestätigung durch die Auffindung von Wachstumsspiralen auf zahlreichen Kristallen verschiedenster Stoffe. Wir haben nun vor einigen Jahren in den organischen Verbindungen ein Material gefunden, das sich in besonderem Maße dazu eignet, die von *Frank* gemachten Voraussagen über das Spiralwachstum zu demonstrieren[6]. Organische Stoffe sind vielfach bei leicht zugänglichen Temperaturen zu verdampfen und sie bilden bei der Sublimation auf ein Deckglas bevorzugt Kristalle mit plattenartigem Habitus aus, die für das Studium des Spiralwachstums besonders geeignet sind. Die Ursache dafür, daß vorallem flächenhaft ausgebreitete Kristalle Spiralwachstum zeigen, sieht *Frank* darin, daß bei dünnen Kristallen, wenn sie eine bestimmte Größe überschrei-



a *b*

Abb. 3. Wachstumsspirale

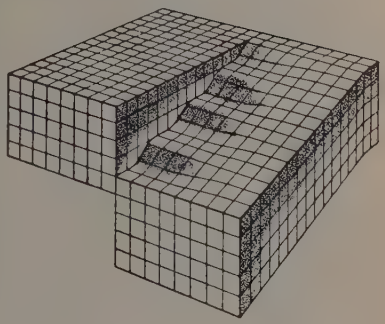


Abb. 4. Vierfache Schraubenversetzung (nach *Fullman*)

ten, Spannungen auftreten, die zur spontanen Bildung von Versetzungen führen.

Mikroskopisch sichtbare Spiralen sind nach *Frank* auf Versetzungen

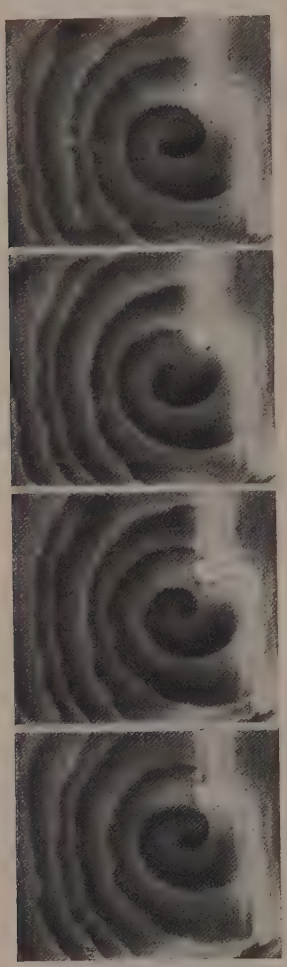


Abb. 5. Spirale auf Diphenylamin

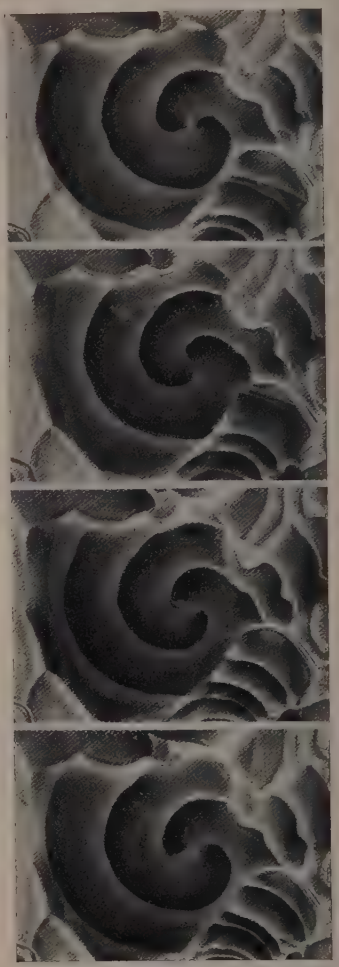


Abb. 6. Doppelspirale auf Phenanthren

von vielfacher Stärke gewachsen. Darunter sind Gruppen von Versetzungen zu verstehen, die sehr nahe beisammen sind und den gleichen Drehsinn besitzen. Abb. 4 zeigt eine vierschichtige Stufe, die von vier Ver-

setzungen gebildet wird. Die Spiralen die bei unseren Untersuchungen auftreten, müssen ausschließlich auf großen Versetzungsgruppen wachsen, da die Stufen von einigen hundert bis zu einigen tausend Å hoch sind. Es kommt dabei auch häufig vor, daß sich aus einer ursprünglich einheitlich erscheinenden Spirale dünne Schichten ablösen, die ganz schnell zum Rand der nächsten Stufe wachsen, ein Beweis für die zusammengesetzte Natur der Spiralen. Prinzipiell ist das Verhalten dieser vielschichtigen Spiralen den Elementarspiralen analog.

Abb. 7. Lamellenbildung

Das Wachsen einer einzelnen Spirale geht nun in der Weise vor sich, daß sich das zentrale Ende kontinuierlich nach innen windet unter Bildung immer neuer Stufen, während der gesamte Spiralrand nach außen wächst (Abb. 5). Zwei Spiralen, die nach der gleichen Richtung drehen, können bei entsprechendem Abstand eine Doppelspirale bilden. Auf Abb. 6 sind zwei etwa gleichstarke Spiralen zu sehen, die regelmäßig ineinander wachsen. Ist der Drehsinn der beiden Spiralen entgegengesetzt, so bilden sie geschlossene Lamellen (Abb. 7).

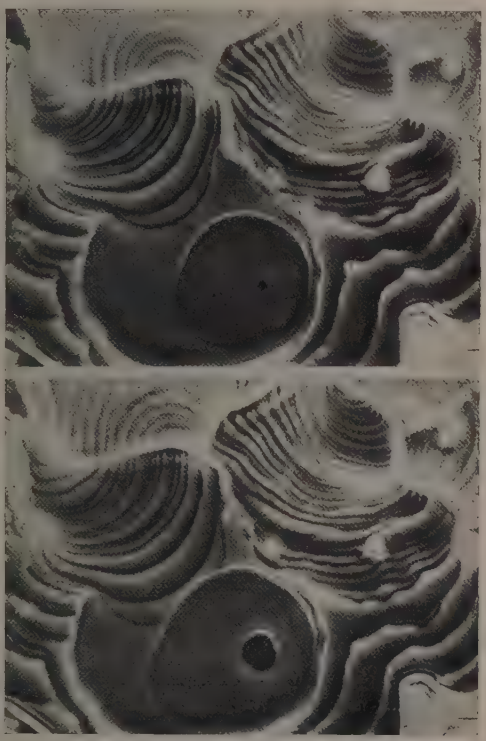


Abb. 8. Scheinbar freie Lamellenbildung auf Borneol

Bei unseren Untersuchungen haben wir auch Lamellenwachstum beobachtet (Abb. 8), an dem die zwei Ursprungsspiralen nicht zu sehen waren, so daß der Eindruck von freier Keimbildung erweckt wird. Es darf wohl angenommen werden, daß in diesem Sonderfall das zentrale Spiralenpaar unterhalb der Erfassungsgrenze der Phasenkontrastmikroskopie

liegt, die Lamellen aber auf dieselbe Weise gebildet werden wie das Modell der Abb. 7 zeigt. Dasselbe gilt für die Teilkegel, die ebenfalls auf Abb. 8 zu sehen sind. Sie treten an Korngrenzen und defekten Stellen auf, an denen von vornherein größere Ansammlungen von Versetzungen zu erwarten sind. Durch das Zusammenwirken von zwei Versetzungen mit verschiedenem Drehsinn läßt sich auch dieses Wachstumsmuster erklären (Abb. 9).

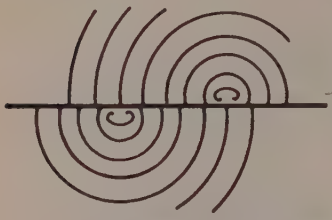


Abb. 9. Lamellenbildung an Korngrenzen

Zusammenfassung

Bei der Sublimation organischer Stoffe unter dem Mikroskop wurden Wachstumsfiguren beobachtet, die geeignet sind, zur Demonstration der von *Frank* 1949 aufgestellten Theorie über das Spiralwachstum der Kristalle zu dienen. Durch Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops kann der Wachstumsvorgang verschiedener Spiralformen und Wachstumsmuster an Hand bei gewöhnlicher Beleuchtung kaum sichtbarer Spiralstufen mit außerordentlicher Deutlichkeit verfolgt werden.

Summary

When organic substances are sublimed under the microscope, growth figures are observed, which are suitable to demonstrate the theory of spiral growth of crystals announced in 1949 by *Frank*. If a phase contrast microscope is employed, the growth process of various spiral forms and growth patterns can be followed with exceptional clarity under ordinary illumination even though the spiral stages are barely visible.

Résumé

Lors de la sublimation des substances organiques sous le microscope, on a observé des figures de croissance qui sont susceptibles de servir à la démonstration de la théorie élaborée par *Franck* en 1949 sur la croissance en spirale des cristaux. L'emploi d'un microscope à contraste de phase permet de suivre facilement le processus de croissance de différentes formes de spirales ainsi que les types de croissance, avec une extraordinaire netteté, alors que les phases du développement en spirale eussent été à peine visibles avec un éclairage ordinaire.

Literatur

[1] *M. Volmer*, Kinetik der Phasenbildung. Leipzig: Steinkopff. 1935.
[2] *W. Kossel*, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen **1927**, 135.
[3] *J. N. Stranski*, Z. physik. Chem. **136**, 259 (1928).
[4] *M. Volmer* und *W. Schultze*, Z. physik. Chem. (A) **156**, 1 (1931).
[5] *W. K. Burton, N. Cabrera* und *F. C. Frank*, Nature **163**, 398 (1949). *F. C. Frank*, Z. Elektrochem. **56**, 429 (1952).
[6] *M. Brandstätter*, Z. Elektrochem. **56**, 968 (1952); **57**, 438 (1953); Mikroskopie, im Druck.

setzungen gebildet wird. Die Spiralen die bei unseren Untersuchungen auftreten, müssen ausschließlich auf großen Versetzungsgruppen wachsen, da die Stufen von einigen hundert bis zu einigen tausend Å hoch sind. Es kommt dabei auch häufig vor, daß sich aus einer ursprünglich einheitlich erscheinenden Spirale dünne Schichten ablösen, die ganz schnell zum Rand der nächsten Stufe wachsen, ein Beweis für die zusammengesetzte Natur der Spiralen. Prinzipiell ist das Verhalten dieser vielschichtigen Spiralen den Elementarspiralen analog.

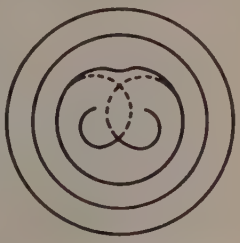


Abb. 7. Lamellenbildung

Das Wachsen einer einzelnen Spirale geht nun in der Weise vor sich, daß sich das zentrale Ende kontinuierlich nach innen windet unter Bildung immer neuer Stufen, während der gesamte Spiralrand nach außen wächst (Abb. 5). Zwei Spiralen, die nach der gleichen Richtung drehen, können bei entsprechendem Abstand eine Doppelspirale bilden. Auf Abb. 6 sind zwei etwa gleichstarke Spiralen zu sehen, die regelmäßig ineinander wachsen. Ist der Drehsinn der beiden Spiralen entgegengesetzt, so bilden sie geschlossene Lamellen (Abb. 7).

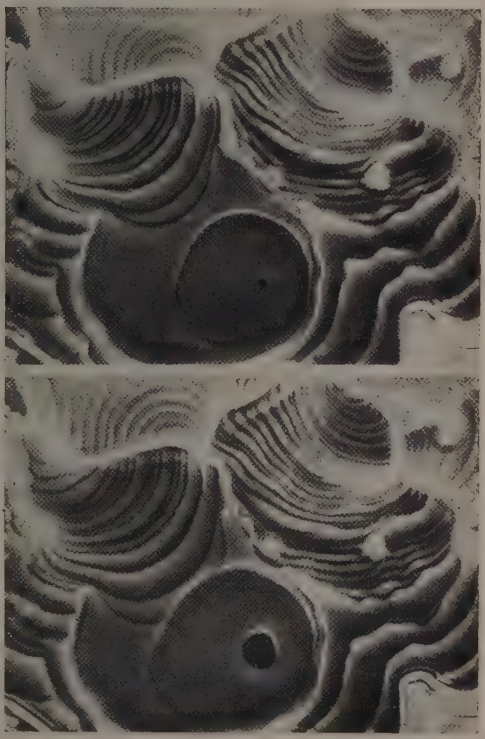


Abb. 8. Scheinbar freie Lamellenbildung auf Borneol

Bei unseren Untersuchungen haben wir auch Lamellenwachstum beobachtet (Abb. 8), an dem die zwei Ursprungsspiralen nicht zu sehen waren, so daß der Eindruck von freier Keimbildung erweckt wird. Es darf wohl angenommen werden, daß in diesem Sonderfall das zentrale Spiralenpaar unterhalb der Erfassungsgrenze der Phasenkontrastmikroskopie

liegt, die Lamellen aber auf dieselbe Weise gebildet werden wie das Modell der Abb. 7 zeigt. Dasselbe gilt für die Teilkegel, die ebenfalls auf Abb. 8 zu sehen sind. Sie treten an Korngrenzen und defekten Stellen auf, an denen von vornherein größere Ansammlungen von Versetzungen zu erwarten sind. Durch das Zusammenwirken von zwei Versetzungen mit verschiedenem Drehsinn läßt sich auch dieses Wachstumsmuster erklären (Abb. 9).

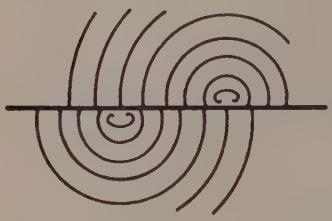


Abb. 9. Lamellenbildung an Korngrenzen

Zusammenfassung

Bei der Sublimation organischer Stoffe unter dem Mikroskop wurden Wachstumsfiguren beobachtet, die geeignet sind, zur Demonstration der von *Frank* 1949 aufgestellten Theorie über das Spiralwachstum der Kristalle zu dienen. Durch Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops kann der Wachstumsvorgang verschiedener Spiralformen und Wachstumsmuster an Hand bei gewöhnlicher Beleuchtung kaum sichtbarer Spiralstufen mit außerordentlicher Deutlichkeit verfolgt werden.

Summary

When organic substances are sublimed under the microscope, growth figures are observed, which are suitable to demonstrate the theory of spiral growth of crystals announced in 1949 by *Frank*. If a phase contrast microscope is employed, the growth process of various spiral forms and growth patterns can be followed with exceptional clarity under ordinary illumination even though the spiral stages are barely visible.

Résumé

Lors de la sublimation des substances organiques sous le microscope, on a observé des figures de croissance qui sont susceptibles de servir à la démonstration de la théorie élaborée par *Franck* en 1949 sur la croissance en spirale des cristaux. L'emploi d'un microscope à contraste de phase permet de suivre facilement le processus de croissance de différentes formes de spirales ainsi que les types de croissance, avec une extraordinaire netteté, alors que les phases du développement en spirale eussent été à peine visibles avec un éclairage ordinaire.

Literatur

[1] *M. Volmer*, Kinetik der Phasenbildung. Leipzig: Steinkopff. 1935.
[2] *W. Kossel*, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen **1927**, 135.
[3] *J. N. Stranski*, Z. physik. Chem. **136**, 259 (1928).
[4] *M. Volmer* und *W. Schultze*, Z. physik. Chem. (A) **156**, 1 (1931).
[5] *W. K. Burton, N. Cabrera* und *F. C. Frank*, Nature **163**, 398 (1949). *F. C. Frank*, Z. Elektrochem. **56**, 429 (1952).
[6] *M. Brandstätter*, Z. Elektrochem. **56**, 968 (1952); **57**, 438 (1953); Mikroskopie, im Druck.

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien und dem Österreichischen Holzforschungsinstitut Wien

Über den mikroanalytischen Nachweis des Lignins

Von

Karl Kratzl

(Eingelangt am 16. März 1955)

Gymnospermenlignin (Fichte, Tanne usw.) ist nach *K. Freudenberg*[1] ein Dehydrierungspolymerisat des Coniferylalkohols. Es stellt demnach ein hochmolekulares Kondensat dar, das in Säuren weitgehend unlöslich ist[2] und in dem gewisse Gruppierungen, die *Freudenberg*[1, 3] auch als Zwischenprodukte einer biologischen Dehydrierung des Coniferylalkohols in vitro fassen konnte (I = Dehydrodiconiferylalkohol, II = d,l-Pinoresinol, III = β-Coniferyläther des Guajacylglycerins, IV = Coniferylaldehyd), vorkommen.

Bei den Angiospermen (Buche usw.) tritt als weiterer Baustein die Syringagruppierung hinzu, so daß deren Lignin als Mischdehydrierungspolymerisat des Coniferyl- und Sinapinalkohols aufzufassen ist. Die Monocotyledonen (Bambus usw.) haben noch zusätzlich einen wesentlichen Anteil von p-Hydroxyphenylbausteinen[4].

Neben den bisherigen analytischen Kriterien, wie Unlöslichkeit in Säuren[5] und Methoxylgehalt[6], müssen chemische Abbaureaktionen zur Charakterisierung herangezogen werden, um einen Stoff als Lignin bzw. dem nativen Lignin nahestehend definieren zu können. Dazu dienen außerdem auch physikalische Methoden (z. B. UV- und IR-Spektren).

Botanische Nachweismethoden

Der Botaniker benützt für die Erkennung der Verholzung meist zwei Gruppen von Färbungen: a) Die *Holzfärbungen* und b) die *Holzfarbreaktionen*. Über die nähere Definierung dieser zwei Gruppen wurde schon ausführlich berichtet[7]. Unter den ersten Begriff wollen wir alle diejenigen Färbemethoden einreihen, die verholztes und unverholztes Gewebe mit Farbstoffen verschieden anfärben. Hierher gehören auch die metachromati-

schen Farbstoffe[8]. Im wesentlichen werden die auftretenden Kräfte der Farbstofftheorie entsprechen, also Dipolassoziation, H-Brücken, Salzbindung usw. darstellen. Auch gewisse Löslichkeitseigenschaften (hydrophil — lyophil) und Orientierungseffekte (Chlatrate usw.) spielen hier eine Rolle.

Als Holzfarbreaktionen sollen alle diejenigen Reaktionen verstanden werden, die unter chemischer Veränderung des Lignins vor sich gehen: z. B. unter Oxydation (Mäule, Jayme, $AuCl_3$, $AgNO_3$). Wichtig sind diese Holzfarbreaktionen, bei denen bestimmte Komponenten des Lignins mit an sich ungefärbten Reagenzien reagieren. (Holzreaktion mit Phenol und Aminen.) Hierzu gehört auch die gebräuchlichste, die *Wiesner*sche Phloroglucinsalzsäurereaktion[9]. Als deren Ursache wurde schon früher von *Czapek*[10] und *Hoffmeister*[11], endgültig aber von *Adler*[12], *Kratzl*[13] und *Pew*[14] das Vorhandensein einer Coniferylaldehydseitenkette nachgewiesen.

Durch Vorbehandlung des Holzes mit gewissen Reagenzien (z. B. H_2, NaOCl, CH_2N_2, $NaHSO_3$ usw.) verschwindet seine Fähigkeit, Farbreaktionen zu geben. Die chemischen Vorgänge an der Coniferylaldehydseitenkette wurden auch an Hand von Modellversuchen geklärt[15].

Die Menge der Coniferylaldehydgruppen im Lignin ist sehr gering (ca. 0,1%)[12]. Die zitierten Farbreaktionen erfassen daher nur einen äußerst kleinen Anteil des Lignins und ihr Ausbleiben namentlich nach chemischer Vorbehandlung kann nicht als Abwesenheit des Lignins gewertet werden. Wenn wir das Lignin (nativ) als aromatisches Polymeres bezeichnen, müssen physikalische und chemische Methoden Verwendung finden, die den Aromaten erfassen lassen.

Chemische Nachweismethoden

A. Physikalisch-chemische Methoden

1. Absorption im Ultraviolett

P. W. Lange[16] konnte zeigen, daß an unveränderten mikroskopischen Schnitten des Holzes, das für aromatische Substanzen einigermaßen charakteristische Absorptionsmaximum bei 2800 Å nachzuweisen ist. Es gelang ihm auch, die Lokalisierung des Lignins in der Mittellamelle durch Ultraviolettmikroskopie nachzuweisen. Als einzige Stoffe, die hier noch in Frage kämen, wären Polyfurane zu nennen, die aber, wenn überhaupt, kaum in solchen Mengen vorhanden sein könnten, daß sie Lignin vortäuschen. Die Untersuchungen der Absorption in Lösung sind, wenn nicht bei neutralem pH gearbeitet wird, nur mit großer Kritik zu betrachten, da empfindliche Kohlehydrate schon bei sehr milder Einwirkung von Säuren und Alkalien leicht Absorption vortäuschen können, die zu Irrtümern Anlaß gibt[17].

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien und dem Österreichischen Holzforschungsinstitut Wien

Über den mikroanalytischen Nachweis des Lignins

Von

Karl Kratzl

(Eingelangt am 16. März 1955)

Gymnospermenlignin (Fichte, Tanne usw.) ist nach *K. Freudenberg*[1] ein Dehydrierungspolymerisat des Coniferylalkohols. Es stellt demnach ein hochmolekulares Kondensat dar, das in Säuren weitgehend unlöslich ist[2] und in dem gewisse Gruppierungen, die *Freudenberg*[1, 3] auch als Zwischenprodukte einer biologischen Dehydrierung des Coniferylalkohols in vitro fassen konnte (I = Dehydrodiconiferylalkohol, II = d,l-Pinoresinol, III = β-Coniferyläther des Guajacylglycerins, IV = Coniferylaldehyd), vorkommen.

Bei den Angiospermen (Buche usw.) tritt als weiterer Baustein die Syringagruppierung hinzu, so daß deren Lignin als Mischdehydrierungspolymerisat des Coniferyl- und Sinapinalkohols aufzufassen ist. Die Monocotyledonen (Bambus usw.) haben noch zusätzlich einen wesentlichen Anteil von p-Hydroxyphenylbausteinen[4].

Neben den bisherigen analytischen Kriterien, wie Unlöslichkeit in Säuren[5] und Methoxylgehalt[6], müssen chemische Abbaureaktionen zur Charakterisierung herangezogen werden, um einen Stoff als Lignin bzw. dem nativen Lignin nahestehend definieren zu können. Dazu dienen außerdem auch physikalische Methoden (z. B. UV- und IR-Spektren).

Botanische Nachweismethoden

Der Botaniker benützt für die Erkennung der Verholzung meist zwei Gruppen von Färbungen: a) Die *Holzfärbungen* und b) die *Holzfarbreaktionen*. Über die nähere Definierung dieser zwei Gruppen wurde schon ausführlich berichtet[7]. Unter den ersten Begriff wollen wir alle diejenigen Färbemethoden einreihen, die verholztes und unverholztes Gewebe mit Farbstoffen verschieden anfärben. Hierher gehören auch die metachromati-

schen Farbstoffe[8]. Im wesentlichen werden die auftretenden Kräfte der Farbstofftheorie entsprechen, also Dipolassoziation, H-Brücken, Salzbindung usw. darstellen. Auch gewisse Löslichkeitseigenschaften (hydrophil — lyophil) und Orientierungseffekte (Chlatrate usw.) spielen hier eine Rolle.

Als Holzfarbreaktionen sollen alle diejenigen Reaktionen verstanden werden, die unter chemischer Veränderung des Lignins vor sich gehen; z. B. unter Oxydation (Mäule, Jayme, $AuCl_3$, $AgNO_3$). Wichtig sind diese Holzfarbreaktionen, bei denen bestimmte Komponenten des Lignins mit an sich ungefärbten Reagenzien reagieren. (Holzreaktion mit Phenol und Aminen.) Hierzu gehört auch die gebräuchlichste, die *Wiesner*sche Phloroglucinsalzsäurereaktion[9]. Als deren Ursache wurde schon früher von *Czapek*[10] und *Hoffmeister*[11], endgültig aber von *Adler*[12], *Kratzl*[13] und *Pew*[14] das Vorhandensein einer Coniferylaldehydseitenkette nachgewiesen.

Durch Vorbehandlung des Holzes mit gewissen Reagenzien (z. B. H_2, NaOCl, CH_2N_2, $NaHSO_3$ usw.) verschwindet seine Fähigkeit, Farbreaktionen zu geben. Die chemischen Vorgänge an der Coniferylaldehydseitenkette wurden auch an Hand von Modellversuchen geklärt[15].

Die Menge der Coniferylaldehydgruppen im Lignin ist sehr gering (ca. 0,1%)[12]. Die zitierten Farbreaktionen erfassen daher nur einen äußerst kleinen Anteil des Lignins und ihr Ausbleiben namentlich nach chemischer Vorbehandlung kann nicht als Abwesenheit des Lignins gewertet werden. Wenn wir das Lignin (nativ) als aromatisches Polymeres bezeichnen, müssen physikalische und chemische Methoden Verwendung finden, die den Aromaten erfassen lassen.

Chemische Nachweismethoden

A. Physikalisch-chemische Methoden

1. Absorption im Ultraviolett

P. W. Lange[16] konnte zeigen, daß an unveränderten mikroskopischen Schnitten des Holzes, das für aromatische Substanzen einigermaßen charakteristische Absorptionsmaximum bei 2800 Å nachzuweisen ist. Es gelang ihm auch, die Lokalisierung des Lignins in der Mittellamelle durch Ultraviolettmikroskopie nachzuweisen. Als einzige Stoffe, die hier noch in Frage kämen, wären Polyfurane zu nennen, die aber, wenn überhaupt, kaum in solchen Mengen vorhanden sein könnten, daß sie Lignin vortäuschen. Die Untersuchungen der Absorption in Lösung sind, wenn nicht bei neutralem p_H gearbeitet wird, nur mit großer Kritik zu betrachten, da empfindliche Kohlehydrate schon bei sehr milder Einwirkung von Säuren und Alkalien leicht Absorption vortäuschen können, die zu Irrtümern Anlaß gibt[17].

2. *Absorption im Infrarot*

Die Absorption im Infrarot wurde von *Jones*[18], *Freudenberg*[19] und *Brauns*[20] vorwiegend an löslichen Ligninpräparaten untersucht. Wir konnten mit *Tschamler*[21] zeigen, daß auch Holzpulver selbst sowie Säurelignin die für Aromaten charakteristischen Absorptionsbanden zeigen (6,3 und 6,6 μ).

Cellulosederivate gaben nur bei aromatischer Substitution (Tritylcellulose) diese Banden[22]. Bemerkenswert ist, daß ein von uns untersuchtes Polyfurfurol nicht mehr beide Banden zeigte. Es gelang uns auch mit *Tschamler* und *Leutner*[23], an von *Kisser* und *Steininger* angefertigten, 4 μ dicken Holzschnitten (radialen Längsschnitten) besonders scharfe Absorptionsbanden zu erhalten und hier wieder das Vorhandensein von Aromaten nachzuweisen. Eine quantitative Verfolgung der Absorption im Infrarot würde zur Klärung der alten Diskussionsfrage, wieviel aromatischer Anteil im nativen Holz vorhanden ist, beitragen.

B. Chemische Methoden

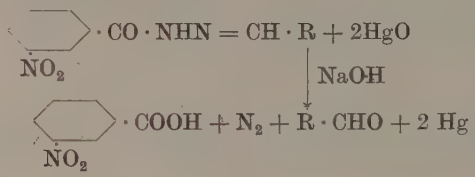
Nachweis der aromatischen Abbauprodukte des Lignins

1. *Oxydation*

Auch chemische Methoden zum Nachweis der aromatischen Struktur stehen zur Verfügung[24]. Namentlich der oxydative Abbau in alkalischer Lösung mit Nitrobenzol oder mit m-Nitrobenzolsulfosäure, der etwa 30 bis 40% des Lignins als aromatische Aldehyde Vanillin, Syringa- bzw. p-Hydroxybenzaldehyd fassen läßt, wurde in neuerer Zeit von *Stone* und *Blundell*[25] im Mikromaßstab durchgeführt und die Aldehyde papierchromatographisch getrennt. Die Einwaage an Holz war etwa 50 mg, an Lignin 10 mg. Die Flecken werden eluiert und aus der Höhe der Absorption im UV die Menge bestimmt, wobei eine Fehlergrenze von 5% angegeben wird. Wir haben diese Methode angewendet, um an besonders schwach verholzten Geweben eine Lignineinlagerung festzustellen. Mußten wir bei früheren Untersuchungen über etiolierte Kartoffelkeimlinge[26] noch mit 100 g Ausgangssubstanz arbeiten, um Vanillin als krist. m-Nitrobenzhydrazon zu fassen, so genügt jetzt 1 Keimling. So wurden auch an einem Bohnenkeimling (2 cm lang) alle 3 Aldehyde nachgewiesen. Auch für botanisch-chemische Betrachtungen (z. B. phylogenetischer Richtung usw.) wurde diese Methode von uns verwendet[7]. Namentlich bei der Untersuchung radioaktiver Primärlignine, die durch Photoassimilation mit ^{14}C erhalten wurden, leistet die Methode Bedeutendes[27]. Allerdings ist hier die papierchromatographische Aufarbeitung weniger geeignet. Wir versuchten mit *Silbernagel*[28], das Vanillin auch bei diesen Ausgangsmengen als krist. m-Nitrobenzhydrazon zu fassen. Beim Abbau von Fichtenholz (100 mg)

oder Säurelignin (30 mg) erhält man so noch 14 mg m-Nitrobenzhydrazon. In einzelnen Fällen wurde mit 10 bis 15 mg Lignin gearbeitet. Aus dem Methoxylgehalt kann auf den Reinheitsgrad der Hydrazone geschlossen werden; er lag meistens über 90%.

Für ^{14}C-markierte Lignine ist es notwendig, diese Abbauprodukte in konstanter spez. Aktivität zu erhalten. Um aus den Hydrazonen die reinen Aldehyde zu erhalten, wurde eine Spaltungsmethode entwickelt, die darauf beruht, die Hydrazone in alkalischer Lösung zu hydrolysieren, wobei die Anwesenheit eines Oxydationsmittels, vor allem Quecksilberoxyd, zur Zerstörung der Hydrazinderivate notwendig ist. Da diese aromatischen Hydroxyaldehyde gegen alkalische Oxydation relativ unempfindlich sind, konnten diese in hohen Ausbeuten wiedergewonnen werden. Die Spaltung verläuft nach folgendem Schema:



(R = 3-Hydroxy-4-methoxyphenyl; 4-Hydroxyphenyl; 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl). Die Menge des wiedergewonnenen Aldehydes war bei Vanillin 98%, bei Syringaaldehyd 96%, bei p-Hydroxybenzaldehyd 97%. Diese Reinigung ist im Milligramm-Maßstab durchführbar.

Für die allgemeine Spaltung der Aldehydhydrazone eignet sich diese Methode nur dann, wenn Substituenten vorhanden sind, die die Löslichkeit des Hydrazons in Alkali bewirken und wenn die entstehenden freien Aldehyde nicht durch Quecksilberoxyd oxydiert (z. B. m-Nitrobenzaldehyd) oder merkuriert werden (z. B. 2,4-Dihydroxybenzaldehyd, o-Vanillin). Die in Freiheit gesetzten Aldehyde können wieder mit m-Nitrobenzhydrazid gefällt werden, bis konstante spez. Aktivität nachweisbar ist. Im Verlauf der Synthesen des Carbonyl-^{14}C-markierten Vanillins, Syringa- und 4-Hydroxybenzaldehyds[29] war diese Fällung und Spaltungsmethode für die oft nicht einfache Aufarbeitung nach einer Rosenmund-Reduktion mit Erfolg anwendbar. Ferner konnte der bei Glukosidierungen nicht umgesetzte Hydroxyaldehyd nach diesem Verfahren quantitativ rückgewonnen werden[30].

2. Hydrogenolyse

Bei der Oxydation gehen 2 Atome der Seitenkette des Phenylpropansystems verloren. Bei der Hochdruckhydrierung hingegen erhält man eine Reihe von Cyklohexylpropanolen[31] in hoher Ausbeute (40 bis 60%).

Diese flüssigen Stoffe müssen durch Feinfraktionierungskolonnen getrennt werden. Eine Mikromethode wurde bis jetzt noch nicht entwickelt.

3. Äthanolyse

Bei der milden Behandlung des Holzes mit 3%iger alkoholischer Salzsäure erhält man nach *Hibbert*[32] etwa 10% an definierten aromatischen Hydroxyketonen, die sog. *Hibbert*schen Bausteine. Beim Gymnospermenlignin sind dies: $R \cdot CO \cdot CH(OC_2H_5) \cdot CH_3$, $R \cdot CH(OC_2H_5) \cdot CO \cdot CH_3$, $R \cdot COCOCH_3$, $R \cdot CH_2 \cdot CO \cdot CH_3$ und Vanillin. (R = 3-Methoxy-4-hydroxyphenyl.) Bei Angiospermen kommen noch analoge Verbindungen mit 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenylsubstitution hinzu.

Diese Methode stellt die mildeste chemische Einwirkung auf Lignin dar, bei der definierte Phenylpropankörper erhalten werden. Die Aufarbeitung und Trennung ist mühsam, so daß wir mit *Schweers*[33] eine papierchromatographische Methode ausgearbeitet haben, um die *Hibbert*schen Bausteine an Holz, bzw. Lignin nachzuweisen. Auch hat *J. A. F. Gardner*[34] beim Studium einer Umlagerungsreaktion des α-Hydroxyconiferylalkohols eine Trennung für diese Reinsubstanzen beschrieben. Mußte man früher mit 250 g Holz arbeiten, so genügen bei unserer Methode 3 bis 5 mg, bei Lignin 1 mg. So war es möglich, an zahlreichen, bisher noch nicht untersuchten Ligninpräparaten wie auch technischen Produkten, deren „Äthanolysierbarkeit" zu den definierten Substanzen zu beweisen. Infolge des Mikromaßstabes konnten wir diese aus einzelnen Zellgewebsbestandteilen, wie z. B. aus der Rinde der Dahlie, nachweisen. Das Grundgewebe, das sich der Rinde anschließt, ist von einzelnen verholzten Gefäßen durchzogen (Phloroglucin/HCl-Reaktion). Dieser Anteil gab die Äthanolysenprodukte gerade noch erkennbar. Das zentrale Mark hingegen ist im botanischen Sinne unverholzt, es wurden auch keine Äthanolysenprodukte erhalten.

Das bedeutungsvollste Resultat dieser Untersuchungen war, daß ein enzymatisches Dehydrierungspolymerisat des Coniferylalkohols (DHP), das nach *Freudenberg*[1] dargestellt wurde, die definierten Phenylpropankörper gab. Damit wurde dessen „Ligninähnlichkeit" auch durch die Äthanolyse bewiesen. Prof. *K. Freudenberg* übersandte uns auch die von ihm erhaltenen Zwischenprodukte I, II, III der biologischen Dehydrierung des Coniferylalkohols (siehe oben). Hier gaben die C—C-kondensierten Dimeren I und II kein, wohl aber III die Äthanolysenprodukte. Damit konnte eine C—C-Kondensation ausgeschlossen und die inzwischen von *Freudenberg*[35] definierte Struktur eines β-Coniferyläthers des Guajacylglycerins bekräftigt werden. Für diese Untersuchungen standen nur einige Milligramm zur Verfügung. Dehnt man die papierchromatographische Trennungsmethode der Äthanolyse und des oxydativen Abbaus auf radioaktiv markierte Lignine aus, so kann man je nach Aktivität des eingesetzten Ausgangsmaterials etwa 10^{-3} μg in den Abbauprodukten fassen.

Zusammenfassung der Nachweismethoden

Um einen Stoff als Lignin bezeichnen zu können, müssen somit neben den botanischen Färbemethoden (Holzfärbungen und Holzfarbreaktionen) sowohl physikalische als auch chemische Kriterien herangezogen werden. Bei den ersteren erscheint die Infrarotabsorption bevorzugt. Von den chemischen Methoden wurde der oxydative Abbau und die Äthanolyse im Mikromaßstab ausgebaut. Beide führen zu definierten chemischen Verbindungen, deren quantitative Erfassung notwendig ist. Die bisherigen Kriterien, wie Unlöslichkeit in Säuren, Löslichkeit in Sulfit oder der Methoxylgehalt allein, genügen nicht. Erst das Zusammenwirken aller Methoden läßt die Beantwortung der Frage zu, ob ein Stoff als Lignin bzw. dem nativen Lignin nahestehend zu definieren ist.

Anwendung des mikroanalytischen Ligninnachweises bei einigen technischen Problemen

Diese mikroanalytischen Methoden wurden von uns bei einigen technischen Problemen verwendet.

Hemicellulosen: Behandelt man Fichtenholz mit 0,1-n Natronlauge 24 Stunden bei Zimmertemperatur, geht vorwiegend ein Teil der Hemicellulosen in Lösung. Diese rohe Hemicellulose enthält 2,2% OCH_3. Es war nun die Frage zu klären, ob dieses Methoxyl zumindest teilweise dem Lignin zuzuordnen ist. Der oxydative Abbau im Mikroautoklaven gab größere Mengen krist. m-Nitrobenzhydrazon, aus dessen Methoxylgehalt sich errechnen ließ, daß 20% des in der Hemicellulose vorhandenen OCH_3 im Vanillin wiedergefunden wurden[7]. Zum Vergleich sei angeführt, daß derselbe Abbau bei Fichtenholz 33% des im Holz vorhandenen Methoxyl im Vanillin wiederzufinden gestattet. Auch eine Buchenholzhemicellulose ergab beträchtliche Mengen Vanillin-Syringaaldehyd im Verhältnis 1 : 3.

Mit Hilfe des oxydativen Abbaus wurde die chemische Einwirkung von Wasser und Temperatur bei der Herstellung des Kunstholzes Staypak und *O. Runkels* „Thermodynholz" untersucht[36]. Bei beiden morphologisch von Holz schon sehr verschiedenen Stoffen konnte von uns der Nachweis erbracht werden, daß trotz Hochtemperatur und Druckbehandlung das Lignin in diesen Hölzern überraschend unverändert ist. Auch technisch gewonnenes Säurelignin der Holzverzuckerung wurde einbezogen. Hier zeigte sich das „neue Rheinaulignin" sowohl beim oxydativen Abbau als auch bei der Äthanolyse dem Salzsäurelignin nach *Willstätter* viel näherstehend, als das „*Scholler-Tornesch*"-Lignin[36].

Überraschend waren die Resultate der Äthanolyse bei einigen anderen technischen Ligninen. Daß aus sog. *Brauns'* Nativlignin[37], aus Perjodatlignin[38] und aus Salzsäurelignin nach *Willstätter*[39] sämtliche Äthanolysenprodukte erhalten wurden, war wahrscheinlich, daß aber auch chemisch

sehr weit veränderte Lignine, wie Fichtenligninsulfosäure, aus technischen Kochungen und Alkalilignin die Äthanolysenprodukte gaben, ist interessant[33]. Auch das Lignin in Faserplatten, die nach verschiedenen Verfahren hergestellt wurden, gab sowohl bei der Oxydation als auch bei der Äthanolyse die definierten Produkte. Hier hat die Art der Herstellung nur in quantitativer Hinsicht einigen Einfluß.

Die Untersuchung an diesen technischen Produkten kann zwar auch mit Makromengen durchgeführt werden, doch bedingt das Arbeiten im Mikromaßstab nicht nur Gewinn an Zeit (die Äthanolyse z. B. dauert 5 Tage, wobei man gleichzeitig bis 10 Substanzen bearbeiten kann, während die Äthanolyse im Makromaßstab pro Substanz [50.000fache Menge] mehrere Wochen in Anspruch nimmt), sondern für gewisse Probleme auch technischer Natur sind die Mikromethoden notwendig. Neben dem Lignin der Hemicellulosen seien hier noch unpublizierte Versuche aus dem Zellstoffgebiet erwähnt.

Kunstseidenzellstoffe (Lenzing) geben je nach Güte (Aufschlußgrad, Bleiche) kleine Mengen von Säurelignin (*Klason* und *Hägglund*, *Klason*, *Halse*). Dieser „Ligningehalt" dient als Kennzahl und ist bei guten Edelzellstoffen sehr gering (0,00 bis 0,05%). *P. Sarten*[40] hatte eine etwas modifizierte *Halse*methode zur quantitativen Erfassung dieses „Lignins" ausgearbeitet. Es war die Aufgabe, diese „Lignine" zu untersuchen, ob sie auch konstitutionschemisch dem nativen Lignin des Holzes nahestehen oder ob sie ganz oder teilweise „Humficate", das heißt, unlösliche, hydrolytische Abbau- und Kondensationsprodukte der Kohlehydrate sind.

Es seien hier nur Versuche mit *A. Graf* an gebleichten Fichtensulfitzellstoffen erwähnt. Das „Lignin" enthielt 8,9% OCH_3 und nur 0,15% S, höher sulfonierte Anteile waren eventuell bei der Bestimmung nach *Halse* und *Sarten* in Lösung gegangen (*F. E. Brauns*[41]). 50 mg wurden oxydativ abgebaut und 12,3 mg Hydrazon erhalten; es war gemäß dem Methoxylgehalt 96,6% reines Vanillin-m-Nitrobenzhydrazon. Berechnet man, wie oben beschrieben, den im Vanillin faßbaren Methoxylgehalt auf das im gesamten „Lignin" vorhandene Methoxyl, so erhält man 15%. *Halse*lignin aus Fichtenholz gab 17%; das heißt, daß sich die im Lignin aus gebleichtem Sulfitzellstoff vorliegenden Methoxylkörper auch in quantitativer Hinsicht dem *Halse*lignin gleich verhalten, daß diese also echtes Säurelignin darstellen. Die Äthanolyse, ausgeführt mit 30 mg, ergab alle definierten *Hibbert*schen Bausteine. Dieses Resultat war einigermaßen überraschend, da dieses Lignin bereits mehreren tiefgreifenden chemischen Einflüssen ausgesetzt war (technischer Sulfitaufschluß, Bleiche, *Halse*hydrolyse). Dies eröffnet uns Hinweise über die Stabilität der primären Konstitution, die zu diesen Phenylpropankörpern führt.

Somit wurde an Hand einiger Beispiele aus der Technik gezeigt, daß auch für diese Probleme die mikroanalytischen Methoden nicht nur Zeit

und Substanz sparend sind, sondern daß es zahlreiche Probleme gibt, die nur mit diesen bearbeitet werden können. Zur Lösung konstitutionschemischer Ligninprobleme, namentlich in biochemischer und botanischer Richtung stellen diese Methoden die einzige Möglichkeit dar.

Diese Arbeiten wurden von der Österreichischen Gesellschaft für Holzforschung und von der Zellwolle Lenzing AG. unterstützt, wofür auch hier bestens gedankt sei.

Zusammenfassung

Gymnospermenlignin ist nach *Freudenberg* als enzymatisches Dehydrierungspolymerisat des Coniferylalkohols aufzufassen. Angiospermenlignin als Mischdehydrierungspolymerisat des Sinapin- und Coniferylalkohols, während bei Monocotyledonen noch größere Mengen des p-Hydroxyphenylbausteins hinzukommen.

Dem botanischen Nachweis, geführt durch Holzfärbungen und Holzfarbreaktionen steht der Nachweis der definierten chemischen Struktur gegenüber. Die Holzfarbreaktionen erfassen nur kleine Teile des Ligninmoleküls, so z. B. die Coniferylaldehydseitenkette.

Von den physikalisch-chemischen Methoden werden die Ultraviolettstudien *P. W. Langes* und die Absorption im Infrarot diskutiert. Es konnten an Mikroschnitten scharfe Absorptionsbanden aromatischer C—C-Dehnfrequenzen nachgewiesen werden. Von den chemischen Methoden wurde mit *H. Silbernagel* die Oxydation zu Vanillin (30%) im Mikromaßstab durchgeführt und eine Spaltungs- und Reinigungsmethode des m-Nitrobenzhydrazons des Vanillins und anderer aromatischer Hydroxyaldehyde entwickelt. Diese dient namentlich zur Erlangung von Abbauprodukten konstanter spez. Aktivität aus radioaktiven Ligninen. Mit dieser Oxydationsmethode sowie auch dem papierchromatographischen Nachweis aromatischer Hydroxyaldehyde nach *Stone* und *Blundell* wurden ontogenetische und phylogenetische Reihen des Pflanzensystems untersucht.

Bei der Äthanolyse des Holzes erhält man 10% def. aromatische Hydroxyketone, bei Gymnospermen die 4 *Hibbert*schen Bausteine. Es wurde eine papierchromatographische Methode ausgearbeitet und zahlreiche Lignine untersucht. Ein nach *Freudenberg* hergestelltes biologisches Dehydrierungspolymerisat des Coniferylalkohols (DHP), sowie nur eines der von *Freudenberg* als Zwischenprodukte der biologischen Kondensation isolierten Dimeren gab diese Äthanolysenprodukte. Bei letzteren war zwischen den C—C-kondensierten und C—O—C-kondensierten Dimeren eine klare Trennung durchzuführen.

Auch technische Produkte, die starken chemischen Einflüssen ausgesetzt waren, wie Alkalilignin und Ligninsulfosäure, gaben die Äthanolysenprodukte. Es ist uns mit *E. Klein* gelungen, die „*Hibbert*schen Bau-

steine" aus technischer Sulfitablauge auch in Form von kristallisierten Derivaten zu isolieren sowie die Abspaltung der Sulfogruppe bei Modellversuchen unter Äthanolysebedingungen nachzuweisen, wenn diese in α-Stellung zum Phenylkern steht.

Einige weitere Anwendungen mikroanalytischer Methoden auf Probleme der Technik werden beschrieben, so der oxydative Abbau von methoxylhältigen Hemicellulosen, bei denen Vanillin isoliert wurde, der Abbau und die Äthanolyse von Faserplatten, Staypak und Thermodynholz sowie der Holzverzuckerungslignine nach *Rheinau* und *Scholler-Tornesch*. Die Mikromethoden in der Ligninchemie bedingen nicht nur Zeit und Substanzgewinn, sondern sind oft die einzige Möglichkeit, um nicht nur wissenschaftliche, sondern auch technische Probleme zu behandeln, was letzteres besonders bei der Definierung von Säureligninen aus Edelzellstoffen bewiesen wird.

Als Zusammenfassung der Nachweismethoden, die im Mikromaßstab erprobt sind und die herangezogen werden müssen, um einen Stoff als Lignin bzw. dem nativen Lignin nahestehend definieren zu können, seien angeführt: Botanische Färbemethoden (Holzfärbung und Holzfarbreaktionen), Absorption in Ultraviolett und Infrarot. Oxydativer Abbau zu aromatischen Hydroxyaldehyden, Erfassung von deren Menge und Methoxylbilanz. Äthanolyse zu den definierten *Hibbert*schen Bausteinen sowie eventuell Sulfitierung und Spaltung der gebildeten Ligninsulfosäure zu Vanillin/Acetaldehyd. Die bisherigen Kriterien, wie Unlöslichkeit in Säuren, Methoxylgehalt usw., genügen nicht zur konstitutionschemischen Zuordnung.

Summary

According to *Freudenberg*, lignin of gymnosperms is to be viewed as enzymatic dehydrogenation polymerizate of coniferyl alcohol. Lignin of angyosperms similarly is a mixed dehydrogenation polymerizate of sinapic and coniferyl alcohol, whereas still larger amounts of the *p*-hydroxyphenyl units are present in the case of monocotyledons.

The botanical identification, by means of wood staining and wood color reactions, is contrasted with the detection of the definite chemical structure. The wood color reactions include only a small part of the lignin molecule, as for instance the coniferyl aldehyde side chain.

Among the physical-chemical methods, the ultraviolet studies by *P. W. Lange* and the absorption in infra red are discussed. Sharp absorption bands of aromatic C — C strain frequencies were observed in micro sections. Among the chemical methods, the author and *H. Silbernagel* studied the oxidation to vanillin (30%) on the microscale, and they developed a fission and purification method for the *m*-nitrobenzhydrazone of vanillin and other aromatic hydroxyaldehydes. This served particularly in arriving at degradation products of constant specific activity from radioactive lignins. Ontogenetic and phylogenetic series of the plant system were investigated by this oxidation method and also by the paper chromatographic detection of aromatic hydroxyaldehydes by the procedure of *Stone* and *Blundell*.

The ethanolysis of the wood yields 10% of aromatic hydroxyketones, in the case of gymnosperms the four "*Hibbert* units." A paper chromatographic method was worked out and many lignins studied. These ethanolysis products were yielded by a dehydrogenation polymerizate of coniferyl alcohol (DHP) prepared by *Freudenberg* and also by one of the dimers isolated by *Freudenberg* as intermediate products of the biological condensation. A clear separation was attained in the latter case between the C-C condensed and the C—O—C condensed dimers.

The ethanolysis products, were given likewise by technical products, which have been subjected to powerful chemical influences, such as alkali lignin and lignin sulfonic acid.

Several other applications of microanalytical methods to technical problems were discussed, such as the oxidative degradation of hemicelluloses containing methoxy groups (vanillin was isolated) and the degradation of and ethanolysis of fiberboard, Staypack, and Thermodynholz as well as the wood sugar lignins after *Rheinau*, and *Scholler-Tornesch*. The micromethods in lignin chemistry affect not only time and yields, but also often provide the sole possibility of handling not only scientific but also technical problems. This was demonstrated especially in the defining of acid lignins obtained from refined cellulose.

A summary is given of the detection methods which were tested on the microscale and which must be called on in order to define a material as lignin or as being close to native lignin. These methods include: botanical staining methods (wood staining and wood color reactions), absorption in ultraviolet and infra red, oxidative degradation to aromatic hydroxyaldehydes, determination of their amount and methoxy balance, ethanolysis to the definite "*Hibbert* units", and possibly sulfitation and fission of the resulting lignin sulfonic acid to vanillin/acetaldehyde. The previous criteria such as insolubility in acids, methoxyl content etc. are not adequate for constitutional chemical assignment.

Résumé

D'après *Freudenberg*, la lignine des gymnospermes doit être considérée comme un produit polymérisé de déshydratation enzymatique de l'alcool conifférylique. De même, la lignine des angiospermes est un produit polymérisé mixte provenant de la déshydratation de l'alcool sinapique et de l'alcool conifférylique, tandis que le motif parahydroxyphényl existe en quantités encore supérieures chez les monocotylédones.

Parallèlement à l'identification botanique effectuée par coloration ou par réactions colorées du bois, il est possible d'effectuer l'identification de la structure chimique définie. Les réactions colorées du bois n'affectent qu'une faible partie de la molécule de lignine, la chaîne latérale de l'aldéhyde conifférylique, par exemple.

Parmi les méthodes physico-chimiques, l'auteur discute les études de *P. W. Langes* dans l'ultra-violet et l'absorption dans l'infra-rouge. On a pu déceler des bandes d'absorption très nettes pour les fréquences de tension de la liaison C — C aromatique sur des microcoupes. Parmi les méthodes chimiques *H. Silbernagel* et l'auteur ont réalisé l'oxydation en vanilline (30%) à l'échelle microchimique, et mis au point une méthode de scission et de purification de la m-nitrobenzhydrazone de la vanilline et d'autres hydroxyaldéhydes aromatiques. Cette dernière méthode sert notamment pour l'obtention de produits de dégradation ayant une activité spécifique constante, à partir de lignines radioactivées.

La mise en oeuvre de cette méthode d'oxydation jointe à l'identification chromatographique sur papier des hydroxyaldéhydes aromatiques, d'après *Stone* et *Blundell* a permis d'effectuer des recherches ontogénétiques et phylogénétiques du système des plantes.

Lors de l'éthanolyse du bois, on obtient 10% d'hydroxycétones aromatiques définies qui sont, pour les gymnospermes les 4 «motifs de *Hibbert*». On a mis au point une méthode de chromatographie sur papier et effectué des recherches sur de nombreuses lignines. L'un des produits biologiques polymérisés de déshydratation de l'alcool coniférylique préparés par *Freudenberg* et l'un des deux dimères isolés par le même auteur comme produits intermédiaires isolés par le même auteur comme produits intermédiaires de la condensation biologique donnaient naissance à ces produits d'éthanolyse. Pour ces derniers on obtenait une séparation très nette entre les dimères condensés en C—C ou en C—O—C.

Certains produits techniques qui avaient été soumis à des fortes influences chimiques, tels de l'alcalilignine et l'acide lignine-sulfonique donnaient également des produits d'éthanolyse.

On décrit encore quelques autres applications des méthodes microanalytiques à des problèmes techniques tels que la dégradation oxydante des hémicelluloses méthoxylées dans lesquelles on a isolé de la vanilline, la dégradation et l'éthanolyse de plaques de fibres, Staypak et Thermodynholz et enfin celui de la lignine de saccharification du bois d'après *Rheinau* et *Scholler-Tornesch*.

L'emploi des microméthodes dans la chimie de la lignine ne se traduit pas seulement par un gain de temps et de substance mais il constitue souvent l'exclusive possibilité de travail aussi bien pour des problèmes scientifiques que techniques comme par exemple, dans ce dernier cas, la définition des lignines acides des celluloses de haute qualité.

En conclusion, pour pouvoir définir une substance telle que la lignine ou encore pour pouvoir définir dans quelle mesure elle est proche de la lignine native il faut faire appel à des méthodes d'identification qui ont été éprouvées à l'échelle microanalytique. Elles comprennent: des méthodes botaniques de coloration (coloration du bois et réactions colorées du bois), l'absorption dans l'ultraviolet et dans l'infra-rouge, la dégradation oxydante en hydroxyaldéhydes aromatiques, le dosage de ces aldéhydes et le bilan des groupes méthoxyles, l'éthanolyse donnant naissance à des «motifs de *Hibbert*» ainsi que l'éventuelle sulfitation et la scission des acides lignine-sulfoniques formés avec production de vanilline et d'acétaldéhyde. Les critères utilisés jusqu'à ce jour tels que l'insolubilité dans les acides, la teneur en groupes méthoxyles etc. ne sont pas suffisants pour permettre d'établir chimiquement la constitution.

Literatur

[1] *K. Freudenberg*, Holz als Roh- u. Werkstoff **11**, 267 (1953).

[2] *A. v. Wacek*, Exper. **2**, 171 (1946).

[3] *K. Freudenberg* und *D. Rasenack*, Ber. dtsch. chem. Ges. **86**, 755 (1953).

[4] *R. H. J. Creighton, R. D. Gibbs* und *H. Hibbert*, J. Amer. Chem. Soc. **66**, 32 (1944). *F. F. Nord* und *G. de Stevens*, Naturwiss. **39**, 479 (1952). *B. Leopold* und Mitarb., Acta Chem. Scand. **6**, 38, 39, 311 (1952).

[5] *W. Stumpf* und *E. Wiesenberger*, Cellulosechem. **18**, 103 (1940).

[6] *A. v. Wacek* und *D. Schroth*, Holz als Roh- u. Werkstoff **9**, 7 (1951).

[7] *K. Kratzl*, Holz als Roh- u. Werkstoff **11**, 269 (1953).

[8] *Th. A. Czaja*, Planta **11**, 582 (1930). *J. Kisser*, Mitt. Österr. Ges. Holzforschung **2**, 28 (1949).

[9] *J. Wiesner*, S. B. Wien Akad. Wiss. **77**, 60 (1828). *J. Kisser* und *A. Steininger*, Mikroskopie **5**, 39 (1950).

[10] *F. Czapek*, Z. physiol. Chem. **27**, 154 (1899).

[11] *C. Hoffmeister*, Ber. dtsch. chem. Ges. **60**, 2062 (1927).

[12] *E. Adler, K. J. Björkquist* und *E. Häggroth*, Acta Chem. Scand. **2**, 93 (1948).

[13] *K. Kratzl*, Mh. Chem. **78**, 173, 392 (1948).

[14] *J. C. Pew*, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 1678 (1951); **74**, 2850, 5784 (1952).

[15] *K. Kratzl* und *E. Wittmann*, Mh. Chem. **85**, 7 (1954).

[16] *P. W. Lange*, Svensk Papperstidn **47**, 267 (1944); **48**, 241 (1945); **50**, 130 (1947); **55**, 217 (1953).

[17] *K. Kratzl* und *H. Silbernagel*, Mh. Chem. **83**, 1022 (1953). *A. W. Sohns*, Papier **4**, 379 (1950). *E. Pacsu* und *L. A. Hiller*, J. Amer. Chem. Soc. **70**, 523 (1948). *B. L. Scalett* und *I. H. Gardner*, J. Amer. Chem. Soc. **67**, 1934 (1945).

[18] *E. J. Jones*, J. Amer. Chem. Soc. **70**, 1984 (1948); TAPPI **32**, 167 (1949).

[19] *K. Freudenberg, W. Siebert, W. Heimberger* und *R. Kraft*, Ber. dtsch. chem. Ges. **84**, 961 (1951).

[20] *F. E. Brauns* und *H. Seiler*, TAPPI **35**, 67 (1952).

[21] *K. Kratzl* und *H. Tschamler*, Mh. Chem. **83**, 786 (1952).

[22] *L. P. Kuhn*, Analyt. Chemistry **22**, 276 (1950).

[23] *H. Tschamler, K. Kratzl, R. Leutner, J. Kisser* und *A. Steininger*, Mikroskopie **8**, 238 (1953).

[24] *K. Freudenberg* und *W. Lautsch*, Naturwiss. **27**, 227 (1939). *K. Freudenberg, W. Lautsch* und *K. Engler*, Ber. dtsch. chem. Ges. **75**, 857 (1942). *W. Lautsch*, Cellulosechem. **19**, 69 (1941).

[25] *J. E. Stone* und *M. J. Blundell*, Analyt. Chemistry **23**, 771 (1951).

[26] *K. Kratzl*, Exper. **6**, 110 (1948).

[27] *J. E. Stone*, Canad. J. Chem. **31**, 207 (1953). *K. Kratzl*, Abstr. of Papers XIIIth Int. Congress of Pure a. Applied Chemistry, Stockholm 1953, S. 253. *St. A. Brown, K. G. Tanner* und *J. E. Stone*, Canad. J. Chem. **31**, 755 (1953).

[28] *H. Silbernagel*, Mh. Chem., **86**, 256 (1955).

[29] *K. Kratzl* und *G. Billek*, Mh. Chem. **84**, 406 (1953); Holzforschung **7**, 66 (1953).

[30] *K. Kratzl* und *G. Billek*, Mh. Chem. **85**, 845 (1954).

[31] *E. E. Harris* und *H. Adkins*, Paper Trade J. **107**, 20, 38 (1938). *E. E. Harris, J. D'Ianni* und *H. Adkins*, J. Amer. Chem. Soc. **60**, 1467 (1938). *L. M. Cooke, J. L. McCarthy* und *H. Hibbert*, J. Amer. Chem. Soc. **63**, 3052 (1941).

[32] *A. B. Cramer, M. J. Hunter* und *H. Hibbert*, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 509 (1939). *L. Brickman, W. L. Hawkins* und *H. Hibbert*, J. Amer. Chem. Soc. **62**, 2149 (1940). Siehe auch *F. E. Brauns*, The Chemistry of Lignin, New York: Academic Press. 1952, S. 465—479.

[33] *K. Kratzl* und *W. Schweers*, Mh. Chem. **85**, 1046, 1164 (1954).

[34] *J. A. F. Gardner*, Canad. J. Chem. **32**, 532 (1954).

[35] *K. Freudenberg, H. Schlüter* und *W. Eisenhut*, Naturwiss. **41**, 576 (1954).

[36] *K. Kratzl* und *H. Silbernagel*, unveröffentlicht.

[37] *F. E. Brauns*, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 2130 (1939).

[38] *P. F. Ritchie* und *C. B. Purves*, Pulp a. Paper Mag. Can. **48**, 74 (1947).

[39] *E. Hägglund* und *H. Richtzenhain*, TAPPI **35**, 281 (1952).

[40] *P. Sarten*, unveröffentlicht.

[41] Privatmitteilung.

Aus der Hygienisch-bakteriologischen Untersuchungsanstalt der Stadt Wien

Nachweis von Erdölprodukten in natürlichen Wässern durch Fluoreszenz*

Von

Berther Nietsch

Mit 1 Abbildung

(Eingelangt am 1. April 1955)

Eine Verunreinigung des Bodens in der Umgebung einer Fund- oder Verarbeitungsstätte von Mineralöl hat meistens sehr ungünstige Folgen für das Grund- oder Quellwasser, das zur Versorgung der betreffenden Gegend mit Trinkwasser dienen soll. Da in Trinkwässern schon sehr geringe Mengen von Erdölprodukten stören können, ist es für den Wasserfachmann wünschenswert, auch minimale Verunreinigungen durch solche Substanzen leicht und verläßlich nachweisen zu können. Ein solcher Nachweis erlaubt nicht nur, die bestehende Verunreinigung des Wassers festzustellen, sondern auch die Ausdehnung oder das Fortschreiten der Boden- bzw. Grundwasserverunreinigung zu bestimmen (z. B. durch Untersuchung bestehender Brunnen oder eigens angelegter Probesonden). Über Fälle aus der Praxis wurde an anderer Stelle berichtet[1].

Bei den Versuchen, die schon bei flüchtiger Beobachtung im Tageslicht auffallende Fluoreszenz schwach bzw. hell gefärbter und durchscheinender Erdölprodukte mit Hilfe künstlicher Anregung auf alle derartigen Substanzen auszudehnen und damit zu deren qualitativer und annähernd quantitativer Bestimmung in natürlichen Wässern nutzbar zu machen, war die Absicht leitend, eine Methode zur Verfügung zu haben, die im Vergleich mit den gravimetrischen Methoden der „Deutschen Einheitsverfahren" und der „Standard Methods" der USA möglichst wenig Zeit

* Herrn Universitätsprofessor Dr. *F. Faltis*, em. Vorstand des Pharmazeutisch-chemischen Institutes der Universität Wien, zum 70. Geburtstag in dankbarer Erinnerung an die in seinem Institut verbrachten Lehrjahre gewidmet.

und (abgesehen von der UV-Lampe) möglichst einfache Hilfsmittel beanspruchen und zudem noch den Nachweis geringster Substanzmengen zulassen sollte.

Als UV-Lichtquelle verwendete ich die Analysenquarzlampe der Wiener Firma „Astralux", die überwiegend die Strahlung der stärksten Hg-Linie von 365 bis 366 mμ liefert. Eine Steigerung der Empfindlichkeit des Nachweises durch Verwendung einer Niederdrucklampe, die das Licht der Wellenlänge 2537 Å aussendet, ist nicht möglich. Es zeigte sich nur eine sehr schwache Fluoreszenz der betreffenden Proben, die zu einer praktischen Verwendung nicht ausreichte.

Dagegen ließ sich eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität bei Verwendung von Hochdrucklampen (365 bis 366 mμ) bewirken, wenn eine Lampe mit kurzem, senkrecht stehendem Brenner benützt wurde; dessen Licht fiel durch ein entsprechend klein dimensioniertes Filter mit geeigneter Blende annähernd punktförmig auf einen zur Achse des einfallenden Lichtes schief gestellten Hohlspiegel. Das am besten in einem Winkel von ca. 30° reflektierte Lichtbündel passierte eine in zweckmäßiger Weise aufgestellte, die zu prüfende Flüssigkeit enthaltende zylindrische Küvette, die auf der Ein- und Austrittseite je ein Quarzfenster trug. Durch diese Maßnahme war gegenüber den unter der gebräuchlichen UV-Lampe beobachteten Proben ein deutlicher Effekt zu erzielen. Dieser Kunstgriff verlangt indes Vorrichtungen, die der eingangs erwähnten Absicht nicht entsprechen. In den Rahmen einer möglichst einfachen Ausrüstung gehört auch die Verwendung eines der gangbaren Lampenmodelle.

Es war nun festzustellen, auf welchem Wege der Gehalt eines natürlichen Wassers an Erdölprodukten fluoreszenz-kolorimetrisch am besten gemessen werden kann und wie groß die Empfindlichkeit dieses Nachweises ist.

Für meine Versuche standen mir fünf verschiedene Ölproben zur Verfügung, und zwar zwei Raffinate (Autoöl 12 bis 14/50° E, Transformatorenöl hochraffiniert, österreichischer Herkunft) und drei Roh- bzw. Rückstandsöle (Sattdampf-Zylinderöl, Schlier-Rohöl, sog. „Öl aus dem Kiesgrubenbrunnen", das aus einem durch Kriegseinwirkung stark mit Ölprodukten verunreinigten Brunnen auf dem Gelände einer Ölraffinerie in der Umgebung Wiens stammte).

Über die Beschaffenheit dieser Ölmuster sowie über die Herstellung der zu den Versuchen dienenden Stammemulsionen von Öl in Wasser im Verhältnisse $1 : 10^4$ und deren Haltbarkeit, ferner über die daraus bereiteten Verdünnungsreihen, die bis $1 : 10^9$ reichten, wurde an anderer Stelle berichtet[1, 2]. Ebenso wurde die sehr einfache Versuchstechnik dort beschrieben.

Aus der Literatur über die Fluoreszenz natürlicher Wässer seien hier nur die Arbeiten von *E. Merker*[3] und *H. Ivekovič*[4] angeführt, in denen die In-

tensität der Fluoreszenz solcher Wässer als Funktion des Gehaltes an organischen Stoffen (erfaßbar durch die Bestimmung des Permanganatverbrauches nach *Kubel* und *Tiemann*) nachgewiesen wird. Darauf werden wir uns später nochmals beziehen.

Die Frage, welche Anteile der unterschiedlichen Mineralöle fluoreszieren bzw. welcher Klasse von Verbindungen sie angehören, ist ungeklärt, für den Wasserfachmann allerdings auch ohne praktische Bedeutung.

Jedenfalls bestehen hinsichtlich der Fluoreszenz der ursprünglichen Ölprobe bei den geprüften Sorten deutliche Unterschiede zwischen raffinierten und Rohölen. Während jene leuchtend blau fluoreszieren, zeigen diese einen gelben Grundton mit bräunlichem oder grünlichem Stich. Diesen ursprünglichen Ölproben analog verhielten sich bei der Beobachtung im UV-Lichte auch die Stammemulsionen, und zwar sowohl beim Auftropfen auf Tüpfelpapier, wie auch im Becherglas. (NB. Gläser ohne Eigenfluoreszenz verwenden!)

Die Erscheinung, daß auf dem Tüpfelpapier ein die Fluoreszenzfarbe der ursprünglichen Ölprobe zeigender Kern entsteht, während das Wasser voreilt, ließ *Dangl* und *Nietsch*[5] eine basische Natur der Ölprobe annehmen (vgl. dazu [6]). Nur qualitativ ausgewertete Untersuchungen mittels der Papier-Elektrophorese nach *H. Michl*[7] zeigten jedoch, daß die Stammemulsionen keine Ladung besaßen bzw. unter den Bedingungen des Versuches höchstens schwach negativ geladen waren. Das Verhalten der Stammemulsionen auf Tüpfelpapier ist daher jedenfalls auf *unspezifische Adsorption* und *nicht* auf irgendwelche elektrostatische Erscheinungen zurückzuführen. Diese Feststellungen gelten für bei der Papier-Elektrophorese herrschende Versuchsbedingungen, insbesondere für das dabei vorliegende pH. Somit trifft die Annahme eines basischen Charakters für die Stammemulsionen *nicht* zu.

Während man durch Auftropfen auf Tüpfelpapier eine erkennbare Fluoreszenz nur bis $1 : 10^5$ erhält, ist es bei einiger Übung möglich, den Ölgehalt eines Wassers mit Hilfe der wäßrigen Verdünnungsreihen bis zu einer Menge von $1 : 10^7$ (0,1 mg/l) zu bestimmen. Bei der Vielfalt der Erdölderivate und der technischen Abfallprodukte wird es jedoch immer schwierig sein, in einer mit Mineralölprodukten verunreinigten Wasserprobe und dem für die Vergleichsreihe verwendeten Ölmuster die gleiche oder wenigstens eine sehr ähnliche Fluoreszenzfarbe zu erzielen. Daher wurde nach einem Wege gesucht, die Vergleichbarkeit von Probe und Test zu verbessern und zugleich, wenn möglich, auch die Empfindlichkeit des Nachweises noch zu erhöhen.

Die erste Möglichkeit dazu ergab die Bindung der Ölspuren an ein Adsorptionsmittel. Am geeignetsten erwies sich feinst verriebenes Magnesiumoxyd (DAB VI)[1, 2]. Dieses ist daher für den praktischen Gebrauch allein zu empfehlen. Die Fluoreszenzfarbe aller geprüften Ölmuster entsprach bei Verwendung von Magnesiumoxyd, Kieselgur, Tierkohle

oder Aluminiumhydroxyd als Adsorptionsmittel der Farbe, die sowohl die ursprüngliche Ölprobe wie auch die Stammemulsion zeigten.

Bei der Feststellung der Erfassungsgrenze mit Magnesiumoxyd ergab sich, daß die Raffinate (Autoöl bzw. Trafoöl) noch bei der Verdünnung $1 : 10^9$ gegenüber einer gleich behandelten Blindprobe eine erkennbare Fluoreszenz zeigten. Bei den Roh- bzw. Rückstandsölen lag die Grenze um eine Zehnerpotenz niedriger. Dabei zeigte sich, daß beginnend bei der Verdünnung $1 : 10^5$ die Adsorbate aller Ölproben die charakteristischen Unterschiede ihrer Fluoreszenzfarben verloren und einheitlich gelblich-weiß fluoreszierten, so daß ein Vergleich untereinander leicht möglich war.

Ein hoher Gehalt an oxydierbaren organischen Stoffen (hoher Permanganatverbrauch nach *Kubel* und *Tiemann*) stört den Nachweis mittels Magnesiumoxyd nicht, wie Versuche mit Wasser, das vorher mit Torf geschüttelt wurde und 140 mg Permanganat/Liter verbrauchte, zeigten.

Nach Schütteln der Probe mit ca. 0,01 g Magnesiumoxyd/100 ml und Abfiltrieren wird das Filter (Blauband, Schleicher & Schüll) zur Beobachtung im UV-Licht auf einem Uhrglas ausgebreitet (analog eine Blindprobe). Das Filtrat wird auf praktisch vollständige Entfernung der Ölspuren ebenfalls unter der UV-Lampe geprüft.

Noch vorteilhafter erwies sich die Ausschüttelung der ölhaltigen Wasserprobe mit Äther p. a. (gewöhnlicher Äther hat merkbare Eigenfluoreszenz) oder besser mit Petroläther (DAB VI, $d_{20} = 0{,}645$ bis $0{,}655$).

Es wurde bereits erwähnt, daß die Fluoreszenzfarbe der ursprünglichen Ölprobe beim Auftropfen wäßriger Emulsionen auf Tüpfelpapier ebenfalls auftritt. Anders ist es nun, wenn kein kolloid-disperses System, sondern eine „echte Lösung" vorliegt. Löst man die ursprünglichen Ölproben in Äther oder Petroläther, so haben solche Lösungen eine leuchtend blaue bis graublaue Fluoreszenz. Bei den Raffinaten war die Farbe besonders hell, während sie bei den anderen Ölsorten, die uns zur Verfügung standen, mit grau gemischt war, und zwar um so mehr, je stärker sie milchig getrübt waren. Der allen Ölproben gemeinsame blaue Grundton war aber für den Vergleich viel günstiger als die verschiedenen Fluoreszenzfarben der wäßrigen Emulsionen. Ferner ist die Beobachtung der homogenen Äther- bzw. Petrolätherlösungen exakter ausführbar als die der Filter mit dem Magnesiumoxyd.

Die Fluoreszenzintensität extrem kleiner Konzentrationen, und zwar von 10^{-7} an, kann sowohl beim Adsorptions- wie beim Extraktionsverfahren vom menschlichen Auge nicht mehr unterschieden werden.

Der Nachweis eines Ölgehaltes ist auch nach der Ausschüttelungsmethode bei den Raffinaten bis zu 10^{-9} möglich, bei den Roh- und Rückstandsölen liegt die Grenzkonzentration bei 10^{-7}, evtl. noch bei 10^{-8}.

Hoher Permanganatverbrauch der Wasserprobe ist hier ebenso wenig hinderlich wie bei der Adsorptionsmethode.

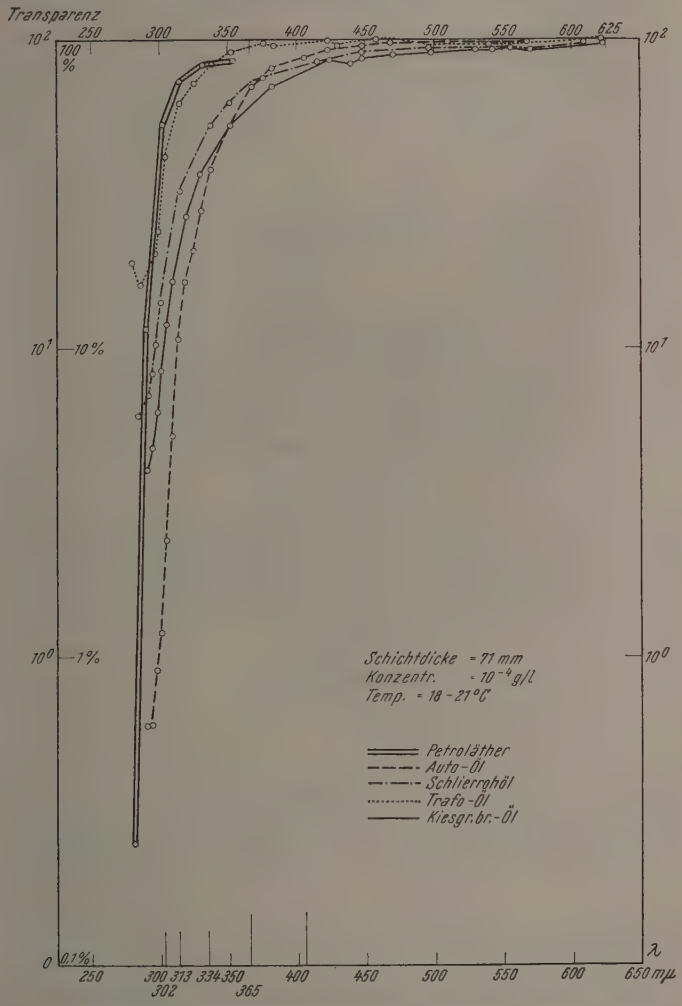


Abb. 1. Lichtabsorption der aus den Stammemulsionen der Ölproben gewonnenen Petrolätherextrakte

Die Lichtabsorption der Petrolätherextrakte der Stammemulsionen aller Ölproben (mit Ausnahme des Sattdampf-Zylinderöles) ebenso wie des reinen Petroläthers wurde mit einem Spektrophotometer gemessen[2].

Das Ergebnis ist aus der Abb. 1 zu entnehmen, in der auf der Abszisse die Wellenlängen in mμ in gewöhnlicher Teilung, auf der Ordinate die Prozente der Transparenz in logarithmischer Teilung aufgetragen sind.

Aus den Absorptionskurven läßt sich Folgendes ableiten:

1. Petroläther in der zu den Versuchen verwendeten Qualität (DAB VI, $d_{20} = 0{,}645$ bis $0{,}655$) absorbiert bei der stärksten Hg-Linie (365 bis 366 mμ) nicht mehr, während er bei der Resonanzlinie wegen totaler Absorption als Lösungsmittel praktisch unbrauchbar wäre, das heißt, bei dieser Wellenlänge kommt eine brauchbare Fluoreszenz nicht mehr zustande. Für die Untersuchungen mittels einer Hochdrucklampe von der Art der verwendeten „Astralux"-Lampe ist er als Extraktionsmittel somit sehr gut geeignet.

2. Die Petrolätherextrakte der Ölproben lassen unter den erwähnten Bedingungen bei der Wellenlänge 365 bis 366 mμ 60 bis 70% des eingestrahlten Lichtes durch. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Ölsorten sind bei dieser Wellenlänge nicht sehr groß. Theoretisch wäre also eher eine Lichtquelle vorzuziehen, die überwiegend die Strahlung von 300 . . . 320 mμ liefert. Unter den handelsüblichen Geräten ist eine solche aber m. W. zur Zeit nicht vorhanden.

3. Die den Ölproben eigene, verschiedene Fluoreszenzfarbe müßte eigentlich erkennbar sein, wenn das menschliche Auge imstande wäre, diese Unterschiede zu erfassen. So aber tritt, besonders bei höheren Verdünnungen, die weitgehend ähnliche Farbe bei allen geprüften Ölsorten auf, und zwar das oben erwähnte Blau in seinen Schattierungen von Weißlichblau bis Graublau. Möglicherweise spielt bei den höheren Verdünnungen doch auch ein Einfluß des Lösungsmittels auf die Farbe eine Rolle.

Die hier beschriebenen Methoden sind dazu bestimmt, Spuren von Erdölprodukten in natürlichen Wässern qualitativ und annähernd quantitativ zu erfassen. Bei den in Betracht kommenden Wasserarten handelt es sich vorwiegend um solche, die zur Trinkwasserversorgung in Betracht kommen. Jedoch ist der Nachweis so geringer Mengen von Erdölprodukten auch für Kesselspeisewässer und Kondensate von Bedeutung.

In Abwässern sind Ölgehalte, die in einem natürlichen (d. h. Boden- oder Oberflächen-) Wasser bereits stören, noch tragbar, ohne die Wirkung einer biologischen Klärung im wesentlichen zu beeinträchtigen. Zur Bestimmung der in diesen Fällen in Frage kommenden Ölgehalte ist die gravimetrische Methode der „Einheitsverfahren" sehr gut geeignet. Der fluoreszenzanalytische Nachweis wird, wie oben gesagt wurde, zwar durch die hohe Oxydierbarkeit eines Abwassers nicht gestört. Jedoch können, wie orientierende Versuche gezeigt haben, andere in Abwässern vor-

kommende Stoffe den Nachweis in der hier beschriebenen Weise behindern. Er bietet daher, wenigstens vorläufig, gegenüber der Methode der „Einheitsverfahren" bei der Untersuchung von Abwässern keinen Vorteil.

In natürlichen Wässern lassen sich Verunreinigungen durch Erdölprodukte bis zu einer Menge von 1 μg/l mittels einer handelsüblichen Analysenquarzlampe nachweisen. Wie vorläufige Versuche wahrscheinlich machten, könnte die Empfindlichkeit des Nachweises noch gesteigert werden; doch wäre dies nur von theoretischer, nicht aber von praktischer Bedeutung.

Den Herren Dr. *Hans Adler* (II. Physikalisches Institut der Universität Wien) und Dr. *H. Michl* (II. Chemisches Laboratorium der Universität Wien) danke ich herzlichst für ihre Gastfreundschaft und Unterstützung bei den physikalischen Messungen.

Zusammenfassung

Verunreinigungen des natürlichen Wassers durch Erdölprodukte lassen sich nach Adsorption an Magnesiumoxyd oder nach Extraktion mit Äther oder Petroläther durch ihre Fluoreszenz im UV-Licht einer üblichen Analysenquarzlampe bis zu einer Menge von 1 μg/l nachweisen.

Summary

Contamination of natural waters through petroleum products can be detected by means of their fluorescence in the ultraviolet light of an ordinary quartz lamp in amounts as small as 1 μg/liter. The impurities are adsorbed on magnesium oxide or extracted with ether or petroleum ether.

Résumé

La pollution d'eaux naturelles par des produits pétroliers peut être mise en évidence jusqu'à une limite de 1 μg/l après adsorption sur magnésie ou après extraction à l'éther ou à l'éther de pétrole, par fluorescence sous la lumière UV d'une lampe d'analyse habituelle en quartz.

Diskussion

H. *W. Ruziczka* (Wien): In den Erläuterungen zum Österreichischen Zolltarif werden zur Unterscheidung von Braunkohlenabfall und Erdölabfall die Floureszenzen in alkoholischer Lösung angegeben. Vielleicht könnte man die Fluoreszenz erscheinungen dieser wässrigen, sehr verdünnten Minerallösungen durch Zusatz von Alkohol steigern.

H. *B. Nietsch:* Zunächst habe ich an eine Steigerung der Empfindlichkeit des Nachweises durch die Verwendung der erwähnten Küvetten, nicht aber durch chemische Zusätze gedacht. Immerhin wäre dies möglich, allerdings müßte der Alkohohl nicht dem natürlichen Wasser, sondern dem Aetherextrakt zugesetzt werden.

H. *W. Ruziczka:* Sie sprachen von der möglichen Beeinflussung durch ein Lösungsmittel. Wurde der verwendete Aether auf die Anwesenheit von Peroxyden geprüft?

H. *B. Nietsch:* Nein, doch wurden stets Blindproben durchgeführt; somit war ein Nullwert gegeben.

H. *F. A. Pohl* (Belecke): Nach Ihren Ausführungen ist eine Empfindlichkeit von 1 bis 100 µg/l gegeben. Die Methode ist aber sehr wenig spezifisch, so daß man auf diese Art Erdölprodukte in Abwässern nicht nachweisen könnte. Es wäre nun interessant, wie weit hinter diesem objektiven Nachweis die Empfindlichkeit der subjektiven Feststellung durch den Geruchssinn zurückbleibt. Manche Stoffe lassen sich so viel empfindlicher nachweisen als auf irgendeinem chemischen Wege.

H. *B. Nietsch:* Ich habe immer wieder den Geruch vor allem meiner Verdünnungsreihen geprüft, dabei aber feststellen müssen, daß die Wahrnehmungsfähigkeit des Geruchssinnes bei ein und derselben Person tageweise großen Schwankungen unterliegt. Mitunter waren Verdünnungen von 10^{-7} und 10^{-8} noch wahrnehmbar, an anderen Tagen konnte bei Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} kein Geruch festgestellt werden.

H. *F. A. Pohl:* Waren das Raucher oder Nichtraucher?

H. *B. Nietsch:* Ich bin selbst sehr schwacher Raucher und habe während der Versuche nie geraucht.

H. *F. A. Pohl:* Sie können also keine genauen Zahlenangaben machen?

H. *B. Nietsch:* Nein, dies läßt sich nicht exakt angeben. Ich war selbst der Meinung, es gäbe eine fixe Grenze der Wahrnehmbarkeit, mußte mich aber von dem Gegenteil überzeugen.

H. *F. A. Pohl:* Ich habe die Frage gestellt, da es vielleicht möglich wäre, nach dem Geruch in einem Abwasser vermutete Erdölprodukte eventuell durch Fluoreszenz zu bestätigen. Allerdings kann da ja vieles fluoreszieren.

H. *B. Nietsch:* Ich habe gesehen, daß z. B. viele Farbstoffe von Textilfabriken, Färbereien usw. ebenfalls, wenn auch schwach, fluoreszieren, und manche Phenole. Es wurde auch versucht, verschiedene Phenole auf diese Art nachzuweisen, die ja in Abwässern äußerst lästig sind. Das sind Substanzen, die zwar keine intensive oder überhaupt nennenswerte Fluoreszenz zeigen, aber doch den Erdölnachweis stören könnten. Dieser Fall ist aber bei Grundwässern nicht gegeben.

Literatur.

[1] *B. Nietsch*, Jahrb. „Vom Wasser" **21**, 186 (1954).
[2] *B. Nietsch*, Zbl. ges. Forst- u. Holzwirtschaft, im Druck.
[3] *E. Merker*, Zool. Jahrb. (Physiologie) **49**, 69 (1931).
[4] *H. Ivekovič*, Z. Hygiene **112**, 54 (1931); Chem. Zbl. **1931**, I, 2653.
[5] *F. Dangl* und *B. Nietsch*, Mikrochem. **39**, 333 (1952).
[6] *W. Ostwald*, Die Welt der vernachlässigten Dimensionen. Leipzig: Steinkopff. 1944. S. 64ff.
[7] *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 23, 489, 944 (1951); **83**, 210, 737 (1952).

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse

Détermination microchimique de l'indium

Par

J. Barlot

(Reçu le 31 Mai 1955)

On a proposé pour la détection de l'indium diverses réactions microchimiques cristallines, mais la plupart n'ont qu'un intérêt relatif, parce qu'elles ne sont pas très sensibles ou non spécifiques.

Dans la pratique, on aura surtout à rechercher l'indium en présence du zinc, ou dans le groupe des cations précipitables par le mélange ammoniaque — chlorure d'ammonium, c'est-à-dire avec Al, Fe et Ga.

La réaction qui utilise la formation du fluorure double d'ammonium et d'indium, — $(NH_4)_3InFe_6$ —, donne des octaèdres souvent assez nets, mais malheureusement le sel correspondant d'aluminium présente à peu près les mêmes formes cristallines, d'où une cause d'erreur possible si l'on n'est pas certain de l'absence de l'ion Al.

La formation d'oxalate d'indium, — $In_2(C_2O_4)_3$, $6H_2O$ —, préconisée par quelques auteurs, donne un précipité souvent constitué par des cristaux excessivement petits, difficiles à observer, et surtout à différencier de ceux des oxalates de zinc. Dans le cas d'un mélange avec ces derniers, on peut, au moins théoriquement, faire la séparation par un traitement à l'ammoniaque qui ne dissout pas le sel d'indium, mais les résultats ne sont pas assez probants. De plus il y a lieu de tenir compte de la solubilité de l'oxalate dans l'eau, qui est loin d'être négligeable, même à froid. Le fait d'employer l'acide oxalique ou un oxalate soluble ne change à peu près rien aux résultats.

La diagnose de l'indium au moyen des chloroindates alcalins octaédriques, sels doubles que forme le trichlorure d'indium avec trois molécules d'un chlorure alcalin, est, dans son ensemble plus précise, mais seuls les chloroindates de rubidium et de césium sont utilisables dans la pratique; le sel de potassium, notamment, est trop soluble.

Le chloroindate de césium se présente, — ce qui est normal —, en

cristaux plus petits et moins solubles que ceux du sel de rubidium, mais ils sont toujours très nets et faciles à identifier. On notera cependant l'abondance de formes hémiédriques diverses, dérivées de l'octaèdre type, et qui dessinent fréquemment des silhouettes hexagonales ou des triangles plus ou moins tronqués.

La sensibilité est de l'ordre de 0,0002 à 0,0001 mg. A noter que les sels de Zn, d'Al et de Ga ne sont pas gênants tant que leur pourcentage ne dépasse pas 50%.

La préparation se fait par addition d'un cristal de chlorure de rubidium ou de césium à une goutte de solution chlorhydrique d'indium: la formation des cristaux très réfringents des chloroindates est immédiate, puis se développe avec le temps.

Nous avons constaté que les chlorures alcalins peuvent être remplacés sans aucun inconvénient par des cristaux des nitrates correspondants, à condition que la solution à examiner contienne un léger excès d'acide chlorhydrique.

On a signalé une imperfection dûe au fait que les chloroindates ressemblent beaucoup aux chlorostannates du type $SnCl_4 \cdot 2\,RCl$, mais il est possible, sinon facile, d'éliminer cette cause d'erreur; on remarquera en outre que l'étain est rarement associé à l'indium. La vérification peut se faire en opérant comme suit: à la préparation montrant les cristaux octaèdriques dont on veut préciser la nature, on ajoute une goutte d'une solution aqueuse d'un sulfure alcalin; les chloroindates virent au jaune plus ou moins foncé, tandis que les chlorostannates brunissent.

Cependant la différence des colorations n'est pas toujours très concluante, et de plus il faut procéder à un lavage complet de la préparation avant d'ajouter le sulfure, ce qui peut être très délicat, surtout en présence de fer. Dans ce cas, un lavage imparfait pourrait provoquer la formation d'un voile brun ou noir de sulfure de fer rendant toute observation impossible.

La précipitation de l'indium à l'état métallique ne paraît pas avoir été mise à profit en analyse qualitative, bien que l'on ait parfois utilisé le déplacement par le zinc pour la séparation de certaines quantités d'indium[1].

L'expérience montre que l'indium peut être déplacé de ses solutions salines par différents métaux, notamment par le zinc, l'aluminium et le magnésium. De ces trois corps, le zinc est le plus commode à employer sous l'objectif du microscope. Avec le magnésium on est gêné par le dégagement des bulles d'hydrogène qui se produit dès que le p_H est plus petit que 6; avec l'aluminium la précipitation est souvent difficile à amorcer, très lente à se propager, et fréquemment incomplète.

Nous avons signalé, dans des travaux antérieurs anciens[2], comment

il est possible de déterminer la structure cristalline d'un métal, en étudiant les dendrites qu'il donne lorsqu'il est déplacé de ses solutions par un autre métal plus électro-négatif que lui, et nous avons ainsi, pour la première fois, mis en évidence la symétrie hexagonale du thallium, qui fut confirmée ensuite par d'autres méthodes.

En différents points de la zone de contact entre le métal précipitant et la solution à étudier, se développent des cristaux métalliques, dont les axes servent ensuite de directions privilégiées pour le développement de ce que nous avons appelé les formes squelettiques ou le squelette du cristal. Cette croissance dans les directions des axes de symétrie peut être très rapide, et parfois difficile à suivre au microscope pour cette raison. Dans certains cas, les intervalles laissés entre les axes des cristaux se comblent peu à peu, pour donner des blocs définitifs ayant parfois de grandes dimensions.

Le phénomène observé apparaît en définitive comme la résultante de plusieurs causes distinctes.

1° En premier lieu, la symétrie de structure du métal précipité conditionne la matérialisation des directions privilégiées de croissance.

2° En second lieu, la différence de potentiel entre le métal précipitant et la solution paraît déterminer surtout la vitesse de formation des dendrites, et leur expansion plus ou moins rapide autour du centre initial, sans modifier la symétrie cristalline.

3° Enfin, la résistance mécanique rencontrée par les dendrites dans le milieu où elles se développent perturbe parfois leur croissance; cette résistance peut être dûe à la concentration en sels dissous, à la présence de colloïdes étrangers (gélatines, gommes, etc.), ou à des sous-produits d'hydrolyse. Ces obstacles au développement normal peuvent amener des déformations plus ou moins importantes, lignes infléchies, arborescences, etc., et compliquent les observations.

A remarquer que la croissance d'une dendrite suppose que le contact entre le métal précipitant et les cristaux métalliques en formation ne se rompt pas. Une dendrite brisée ne s'accroît plus, elle peut même se redissoudre totalement. C'est la raison pour laquelle on doit éviter, comme nous l'avons mentionné plus haut, le dégagement de bulles de gaz dans la préparation examinée.

L'indium cristallise dans le système tétragonal, mais diffère peu du cube, en raison du rapport des axes très voisin de 1. On a aussi signalé des aggrégats cristallins en forme d'arborescences, quand on isole de l'indium par électrolyse avec des électrodes pointues.

Nous effectuons la précipitation avec des fragments de zinc distillé pur, mis en contact avec la solution à identifier; celle-ci est de préférence chlorhydrique, et aussi voisine que possible de la neutralité. La précipitation est immédiate; on voit apparaître des files de cristaux d'in-

dium, portant des ramifications de symétrie quadratique caractérisées par un angle constant de 90°. De plus, en faisant légèrement varier la mise au point, on peut observer dans l'épaisseur de la goutte d'autres ramifications dans l'espace, qui matérialisent les axes secondaires des octaèdres.

Avec un peu d'habitude, il est facile de distinguer les dendrites de l'indium de celles du plomb ou de l'étain stanneux, avec lesquelles il y a parfois quelques analogies. Il est d'ailleurs très possible, en cas de doute, de caractériser le dépôt métallique par dissolution dans l'acide nitrique dilué, après lavage complet. L'étain donne facilement un dépôt insoluble d'oxydes; le plomb peut être rapidement identifié par formation des lamelles hexagonales polychroïques d'iodure.

D'autres séries d'essais sont encore en cours, mais il ne semble pas y avoir de perturbations à craindre dans les cas les plus courants.

La sensibilité du test paraît bonne, et l'on a mis en évidence par ce moyen des quantités d'indium de l'ordre de 0,0001 mg.

Résumé

Parmi les réactions microchimiques actuellement connues bien peu se prêtent à une caractérisation facile, dans le cas où l'indium est en mélange avec des quantités notables d'autres métaux du même groupe; la méthode au chloro-indate de rubidium, avec quelques modifications, peut fournir d'utiles indications.

La précipitation de l'indium à l'état métallique, non employée jusqu'à ce jour, permet une détection précise dans de bonnes conditions.

On décrit les observations faites dans différents cas, notamment en présence de fer, d'étain, de cadmium, en utilisant comme métal précipitant le zinc, le magnésium et l'aluminium.

Zusammenfassung

Unter den bis jetzt bekannten mikrochemischen Reaktionen finden sich nur wenige, die sich für einen einfachen Nachweis des Indiums eignen, wenn sich dieses Element in Gesellschaft größerer Mengen anderer Metalle derselben Gruppe vorfindet. Bei gewissen Modifikationen kann sich der auf dem Rubidiumchlorindat beruhende Nachweis nützlich erweisen.

Die Fällung des Indiums als Metall, die bis jetzt nicht verwendet wurde, gestattet einen genauen Nachweis unter günstigen Bedingungen. Es werden die für bestimmte Fälle, besonders für die Gegenwart von Eisen, Zinn und Cadmium unter Verwendung von Zink, Magnesium und Aluminium als Reduktionsmittel durchgeführten Beobachtungen mitgeteilt.

Summary

Among the microchemical reactions that are well known at present few give an easy characterization in the case where indium is present in mixture along with notable amounts of other metals of the same group.

The method employing rubidium chloro—indate may furnish useful indications if it is somewhat modified.

The precipitation of metallic indium, which has hitherto not been employed, gives a precise indication under favorable conditions.

The observations made in the various cases are described, notably in the presence of iron, tin, cadmium, the precipitating metal being zinc, magnesium, or aluminium.

Bibliographie

[1] *Gmelins* Handbuch der anorganischen Chemie, n° **37**, Indium. Berlin: J. Springer. p. 25.

[2] *J. Barlot*, Ann. chim. **6**, 88 (1926).

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Stockholm, Sweden

Investigation of Monoterpenes by Micro Displacement Adsorption

By

Sven-Gösta Blohm* and Gunnar Widmark

With 6 Figures

(Received April 25, 1955)

The main principles of a new micro technique for the analysis of liquids were presented by *Blohm*[1] at the Graz Congress 1950. The method is based on displacement adsorption** and is a micro adaptation of an earlier known macro method which has been described by *Mair*[2]. On analysis, the liquid sample is introduced into the top of a sorption column and is displaced through the column by another liquid which is more strongly sorbed by the packing material (the sorbent) of the column than any of the components of the liquid sample. The components are sorbed according to their affinity for the sorbent and will leave the bottom of the column undiluted in a succession which is in the reverse order of their affinities. Using this micro method[1] which has been elaborated further by *Blohm*[3] measured equal volumes of the outflowing liquid are collected in a set of capillary pipettes and the refractive indices of these fractions are determined using a simple micro technique[4]. Plotting the *refractive indices* against the *fraction number* of the displaced sample a *sorptiogram* is obtained which will give a picture of the homogeneity of the liquid analysed.

In order to standardize the analytical method and to give a wide interpretation of the sorptiogram we recommend that the method should be carried out on the scale described below which was first used by *Blohm*[3] and later by the other author of the present paper[5]. — Using nitrogen

* Present adress: Allergy Research Laboratory Department of Dermatology, Karolinska Sjukhuset, Stockholm, Sweden.

** In what follows the name sorption will be used.

pressure from a cylinder 40.0 μl of the liquid test sample are displaced by abs. ethanol (commercial 99.6%) through a column (250 mm high, inner diameter 1.4 mm) filled with Davison Silica Gel (22-08-x 1926, through 200 mesh, activated for two hours at 140° C). At the bottom of the column the displaced sample is collected in 5.0-μl fractions, an operation which is simply performed by the aid of a set of sliding capillaries. — Theoretically eight undiluted 5-μl fractions would be expected, but naturally in practice not more than seven fractions are uncontaminated by the displacing liquid. The sorptiograms formed by these seven fractions either can be represented diagrammatically or, as proposed by *Widmark*[5], the $n^{25}{}_D$ values can be given withe the fraction number as index, e. g. index homogeneous α-pinene 1.4632, US_{1-7}, where *US* means the unsorbed sample.

From a practical point of view the micromethod is excellent. The apparatus is very simple and can be prepared by any glass blower*. The only instrument required is an ordinary Abbe-type-refractometer (accuracy $\pm$ 0.0001) which is supplied with circulating water from a thermostat ($\pm$ 0.02° C). Furthermore, the micro method is rapid and easily handed. A total analysis of a liquid, e. g. a mixture of the less viscous liquid terpene hydrocarbons, can be performed within 20 minutes after some training.

The range of usefulness of the method has been stated by *Blohm*[3] to include liquids in the fields of the lower homologues of hydrocarbons, chlorinated hydrocarbons, acetates and terpene hydrocarbons. Later investigations by the present authors demonstrate clearly the advantages of the micro method when dealing with problems involving the terpene hydrocarbons.

The essential conditions for a liquid to be suitable for analysis by means of this method are difficult to define, as may be seen from the theoretical discussion below.—However, the following directions may serve as a guide. The liquid must have a lower affinity for the silica gel than ethanol (less hydrophilic), must not be too viscous and must have a boiling point above about 40° C for an uncooled column. The refractive indices of the components investigated and the displacer must be separable within the accuracy of the refractometer. Furthermore, the liquid must not undergo chemical reaction during the passage through the column. On analysing sensitive liquids the advantages of the micro scale is obvious and up to now we have not observed any isomerisation when analysing the terpene hydrocarbons.

The micro method has been used[6, 10] in research on the nature of the

* A completely standardized apparatus can be obtained from Grave Ltd, Malmskillnadsgatan 48 C, Stockholm C, Sweden.

dermatologically active components which are found in commercial turpentine. A necessary condition for all dermatological investigations, where small amounts can cause reaction on sensitive skin, has been that the work should be carried out with pure compounds and the micro method has been found to be a valuable tool. It has also been found possible to separate oxidized terpenes into eczematogenically active and inactive fractions with this micro method[6].

Theoretical Discussion

If the liquids A and B are in contact with a sorbent, such as silica gel, two things can happen, assuming sorption stabilities of the liquids. Either one component is preferentially sorbed over the whole concentration range or only over a section. This can be shown in a diagram with concentration on the y-axis and amount of preferentially sorbed liquid per amount sorbent on the x-axis. A U- or an S-shaped isotherm will be obtained (Fig. 1 *a* and Fig. 2 *a*). The form of the isotherm depends

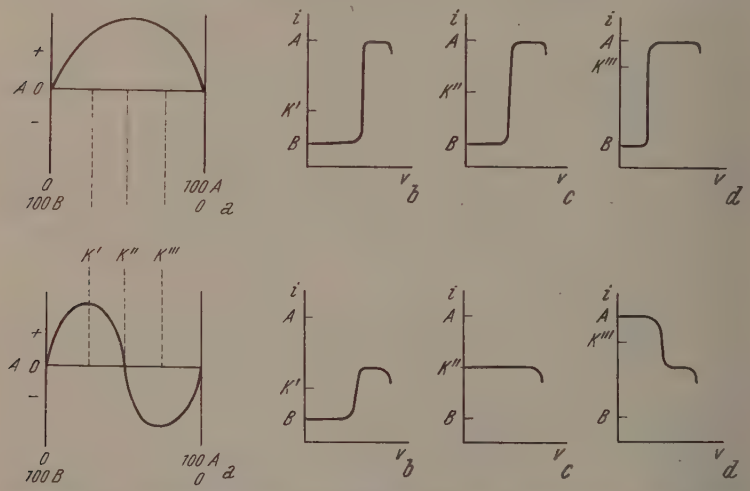


Fig. 1 and 2. Schematic diagrams over how the shape of the sorptiograms depends on the isothermes (see text)

on the nature of A, B, and sorbent, and on the temperature. It can vary from extreme U- to extreme S-form. Many examples are given by *Bartell* et al.[7, 8].

The separating properties of the sorbent can be used more effectively by displacing a liquid through a sorption column than by ordinary percolation or by simple contact with the sorbent. The difference between

these methods is that the ratio of sample to sorbent can be brought to a much higher figure by the displacement technique than by the others.

Displacement sorption of a binary mixture belonging to the *U*-isotherm group will give complete separation of the component over the whole concentration range (assuming the separation effect of the column to be optimal) (Fig. 1*b*, *c*, *d*). If the mixture belongs to the *S*-isotherm group the result of the analysis depends on the initial proportions of the components in the mixture. Between 1 and 2 in Fig. 2*a*, pure *B* but not pure *A* will be obtained. Instead, a mixture which is not separable, and which corresponds to point 2 in Fig. 2*a* is obtained. The opposite result is obtained if the initial mixture lies between 2 and 3 in Fig. 2*a*. (See Fig. 2*d*). The result which is obtained if the mixture corresponds to point 2 in Fig. 2a is independent of the efficiency of the column. No separation, Fig. 2 *c*, will appear and the sorptiogram will show a constant refractive index level. The parallelism between this phenomenon and azeotropes in distillation is obvious; however, the former is not so wellknown. For practical work information about the isotherms is necessary as index homogeneity throughout the samples does not always imply purity.

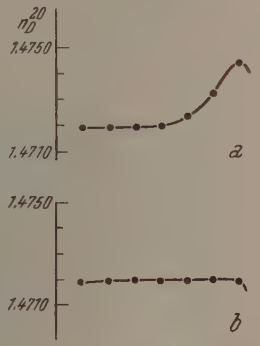


Fig. 3. Purification of Δ^3cearene
a Sorptiogram from a destilled product
b Sorptiogram from a product purified by sorption

In a comprehensive study of the system petroleum hydrocarbons — silica gel, *Hirschler* and *Amon*[9] have found that *S*-isotherms are common

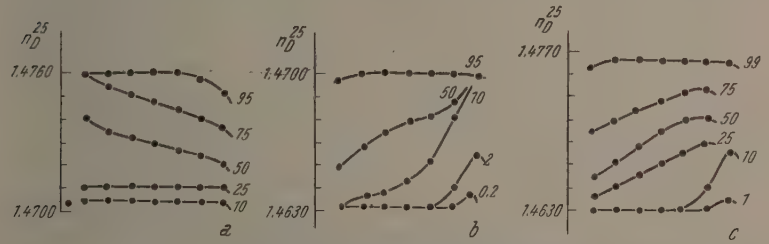


Fig. 4. Sorptiograms from terpene mixtures:
a Δ^3-carene-β pinene (% β-pinene is given)
b Δ^3-carene-α pinene (% Δ^3-carene is given)
c α-pinene-β pinene (% β-pinene is given)

and it is largely from their investigation that the above schematic principles are collected.

In the field of terpenes, the isotherms have been studied insufficiently

and special care must be taken on the interpretation of multicomponent mixtures. Another limiting factor in the case of terpenes would be the chemical reactions caused by the sorbent (gel) of the analytical column, but up to now no such phenomena have been observed — see below and[3]. However, it is likely that the components which are formed in the autoxidation of Δ^3-carene are decomposed partly on passage through the analytical column. Although, in the analytical column, it is possible to concentrate the eczematogenically active material, this is destroyed on a macro scale (3-ml sample), as was demonstrated by a clinical test[10].

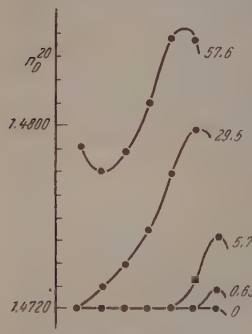


Fig. 5. Sorptiograms from Δ^3-carene with different amount oxygen consumed (ml O_2/g is given)

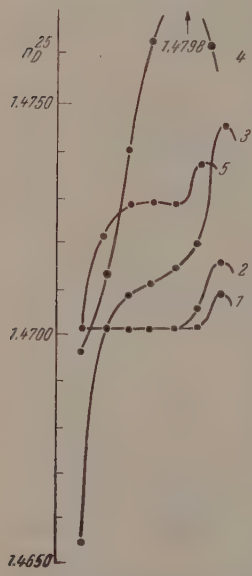


Fig. 6. Sorptiograms from commercial sample of d-limonene and dipentene
1 Eastman Kodak; *2* Eastman Kodak (tech); *3* Hopkins & Williams; *4* Fluka; *5* Schuchardt

Examples in Terpene Analysis

In a series of investigations the authors have studied some terpene hydrocarbons where the homogeneity or change in homogeneity has been examined using the micro method. Some examples from these investigations are given below.

Checking of the Purification Procedure[5, 10, 13]

A commercial sample of Δ^3-carene (Bergvik & Ala) was purified using a sodium method[6] and the sorptiogram Fig. 3*a* was obtained. 0.2 ml of the purified sample was displaced through a column 200 × 3.6 mm and fractions with constant refractive index level were collected. This combined sample had the same refractive index as the sorptiogram obtained by the analytical micro column, Fig. 3*b*.

Sorptiograms of Terpene Mixtures[11]

Sorptiograms of some binary mixtures of Δ^3-carene, α-pinene and β-binene are given in Fig. 4. Within the experimental conditions α-pinene and Δ^3-carene are found to belong to the *U*-isotherm group, Δ^3-carene being sorbed preferentially. The same holds for α-pinene and β-pinene where β-pinene is sorbed preferentially. Δ^3-carene and β-pinene are inseparable at low β-pinene concentrations and this binary system seems

to belong to the *S*-isotherm group. The sequence for 50% concentration is Δ^3-carene, β-pinene and α-pinene.

Oxidation[12]

On oxidizing pure Δ^3-carene a small amount of consumed oxygen gives rise to a marked "peak" at the end of the sorptiogram, Fig. 5. It is of interest to notice that the dermatological effect is confined to the peak of the microsorption.

Examination of Commercial Samples[11]

Fig. 6 gives the sorptiograms of some commercial samples of *d*-limonene and dipentene. In pure form these terpenes both have their n_D^{25} level at 1.4703[13]. No direct conclusion regarding the general qualities of the samples must be drawn from these sorptiograms, as it is not known how the samples have been handled at the dealers.

The investigation has been supported by the Swedish Medical Research Council.

Summary

In the investigation of monoterpenes a micromethod based on displacement adsorption has been used. The theoretical background of the adsorption method has been discussed and examples are given where the micromethod has been used to investigate homogeneity or change in homogeneity.

Zusammenfassung

Für die Untersuchung von Monoterpenen wurde eine auf Verdrängungsadsorption beruhende Mikromethode verwendet. Die theoretischen Grundlagen dieser Adsorptionsmethode werden erörtert und Beispiele für ihre Anwendung bei der Untersuchung der Homogenität bzw. deren Veränderung angeführt.

Résumé

Lors d'une recherche relative aux monoterpènes, on a employé une microméthode basée sur l'adsorption par déplacement. On discute les bases théoriques de la méthode d'adsorption et donne des exemples dans lesquels l'homogénéité ou les variations d'homogénéité ont été étudiées à l'aide de la microméthode.

References

[1] *S.-G. Blohm*, Mikrochem. **36/37**, 322 (1950).
[2] *B. J. Mair*, J. Res. Nat. Bur. Stand. **34**, 435 (1945).
[3] *S.-G. Blohm*, Ark. Kemi **B 6**, No. 30, 317 (1953).
[4] *S.-G. Blohm*, Acta Chem. Scand. **4**, 1495 (1950).
[5] *G. Widmark*, Acta Chem. Scand. **9** (1955). In press.
[6] *S. Hellerström*, *N. Thyresson*, *S.-G. Blohm*, and *G. Widmark*, Acta Dermato-Venereol. **33**, 51 (1953).

[7] *F. E. Bartell* and *G. H. Scheffer*, J. Amer. Chem. Soc. **53**, 2507 (1931).
[8] *F. E. Bartell* and *C. K. Sloan*, J. Amer. Chem. Soc. **51**, 1643 (1929).
[9] *A. E. Hirschler* and *S. Amon*, Ind. Eng. Chem., **39**, 1585 (1947).
[10] *S. Hellerström*, *N. Thyresson*, *S.-G. Blohm*, and *G. Widmark*, J. Invest. Dermat. **24**, 217 (1955).
[11] *G. Widmark* and *S.-G. Blohm*, Acta Chem. Scand. **9** (1955). In press.
[12] *S.-G. Blohm* and *G. Widmark*, Acta Chem. Scand. **9** (1955). In press.
[13] *G. Widmark*, Acta Chem. Scand. **9** (1955). In press.

Contribution from the Department of Chemistry, New York University, New York 3, N. Y.

Microchemistry for the Organic Chemist: A Postgraduate Training Program

By

T. S. Ma* and **Richard F. Sweeney**

With 6 Figures

(Received February 25, 1955)

New York University was one of the pioneer schools in America to introduce microchemistry into the postgraduate curriculum. Under *J. B. Niederl* and *A. A. Benedetti-Pichler*, microchemical courses were organized to fit the American educational system. Within a short time, the University became a center of microchemistry in America, and the laboratory manuals[1,2] developed in its laboratories have become known throughout the country. The founders and their coworkers have since left the University, but their guiding spirit remains. While the training program has undergone certain changes in recent years, the University still maintains its traditional emphasis in the teaching of microchemistry. It is the purpose of this communication to discuss some aspects of the current postgraduate courses in the field of organic microchemistry at New York University.

During the first stage of the development of microchemistry in the United States there was a great demand for organic micro analysts to set up microanalytical laboratories and perform routine analyses. Therefore the postgraduate course at New York University was focussed on the training of *Pregl* techniques. This demand appears to have been met to a large extent, judging from the number of microanalytical laboratories now in industry and research institutions. Some of these microanalytical laboratories have supervisors who train technicians to become microanalysts. These technicians are usually drawn from students with two to four years of college education and very seldom from those at the

* Present address: Department of Chemistry, Brooklyn College, Brooklyn 10, N. Y.

postgraduate level. A few colleges are offering organic microanalysis in the undergraduate curriculum as, e. g. reported by *Kuck*[3] at the First International Microchemical Congress.

The increase in the number of organic microanalysts well versed in the *Pregl* techniques is accompanied by an increase in the desire of the organic chemistry students, especially those interested in research work, to acquire the knowledge of general organic microtechniques. Realizing that the microanalyst is able to perform a complete analysis with about ten milligrams of material, more and more organic chemists are working with research substances on a scale much smaller than that employed in the conventional operations. The investigations of natural products such as vitamins, steroids, alkaloids and antibiotics, and the use of radioactive tracer compounds are typical examples where microtechniques are indispensable. In order to meet the new demand, a course in organic microtechniques has been initiated at New York University. This may be considered the second stage in the development of organic microchemical instruction, in which more attention is given to the *Emich* methods.

General Organic Microtechniques

The course in general organic microtechniques meets once a week in the regular semester or twice a week during the summer session. It consists of fourteen one-hour lectures and about one hundred hours of practical work.

The Lectures. — The series of lectures cover the following topics:

1. Introduction. — Historical, the need and advantages of microtechniques.
2. Determination of Physical Constants. — Melting point, boiling point, density, viscosity, refractive index, optical rotation.
3. General Organic Operations. — Crystallization, filtration, heating, distillation, sublimation, extraction, evaporation, drying.
4. Microsynthesis. — Conversion from macro- to microscale, loss due to transfer and contamination, stirring devices.
5. Isotopic Synthesis. — Labeled compounds, choice of reaction, precautions in radioactive tracer work.
6. Qualitative Microanalysis. — Detection of elements, solubility tests, choice of classification tests, exact micropreparative procedures for derivatives.
7. Adsorption Chromatography. — History, principles, movement of zones, location of zones, recovery of solutes, choice of adsorbent, relative activity of solvents, chemical structure and adsorption.

8. Partition Chromatography. — Theory, partition in column, partition on paper, variations, choice of solvent, applications, electrophoretic separation.
9. Ion Exchange Techniques. — Cation exchangers, anion exchangers, column operation, reactions on the resin, applications.
10. Microscopic Methods. — Chemical microscopy, crystallographic data, applications and limitations, fusion methods.

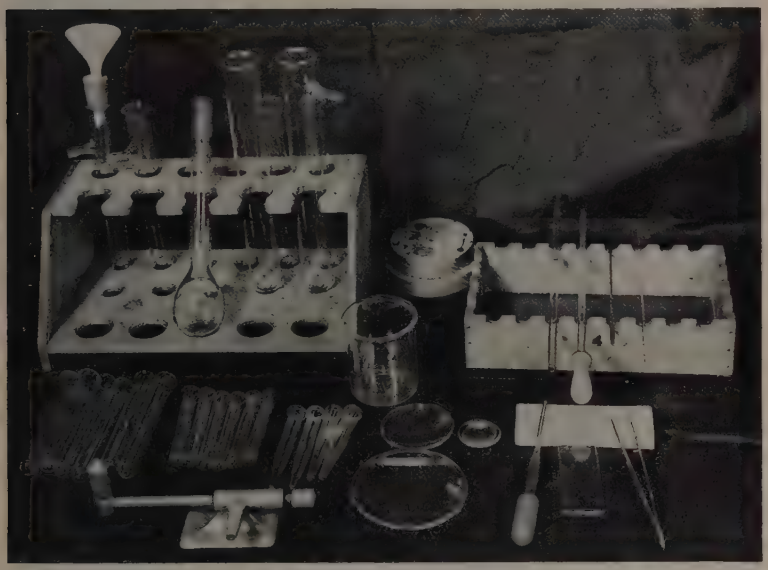


Fig. 1. Student Apparatus Kit

It should be noted that the first part of the lecture series deals mainly with the classical methods of *Emich* while the second half treats the modern methods of separation, identification and synthesis. There is no textbook for this course. The student is given reading assignments from a variety of books such as those written by *Block*, *Le Strange* and *Zweig*[11], *Chamot* and *Mason*[9], *Cheronis*[4], *Feigl*[5], *Kofler*[6], *Lieb* and *Schöniger*[10], *Schneider*[7], and *Williams*[8].

Practical Work. — The laboratory schedule is listed in Table 1. Each student is given a kit, shown in Fig. 1, containing test tubes, centrifuge cones, watch glasses, spot plate, microscope slides, filter funnel, spatula, etc. The test tube rack is designed to hold test tubes of 3-in to 8-in size, and the shallow tray with grooves along its edges serves to support pipets and capillaries and to store the small articles. The student

prepares simple glass apparatus in the first laboratory period and makes other equipment as he proceeds along the course.

Table 1. Laboratory Schedule for General Organic Microtechniques

Period	Assignment
1	Preparation of Some Microchemical Apparatus. — Micro glass rods, capillaries, glass microburner, steam evaporating dish, weighing tubes, pipets.
2	Determination of Physical Constants. — Melting point, eutectic point, boiling point, density.
3	General Methods of Isolation and Purification. — Crystallization, filtration, distillation, steam distillation, sublimation.
4	Microsynthesis on a Decigram Scale. — Cannizzaro reaction, bromination, nitrosylation, nitroglycerine.
5	Synthesis on a Milligram Scale. — Acetanilide, benzenesulfonamide, dinitrobenzene, bromobenzoic acid, thiocarbanilide, anthraquinone, anthracene.
6	Micropreparations Involving Several Steps. — Isolation of carvone from essential oil, benzoin-benzil-benzilic acid.
7	Qualitative Microanalysis. — Tests for elements, solubility tests, classification tests, preparation of derivatives.
8	Adsorption Chromatography. — Separation of colored substances, separation of colorless substances.
9	Partition Chromatography. — Partition in a column, partition on paper.
10	Ion Exchange. — Acid removal, isolation of alkaloids, inversion of sugar.
11—14	Application to Actual Problems.

A pair of students share one set of solid reagents and solutions, shown in Fig. 2. The shelf for solid reagents was originally designed by *R. T. E. Schenck* for use in the course in inorganic microanalysis and holds six rows of 10-ml vials containing all the reagents listed in the textbook by *Benedetti-Pichler*[2]. We have found this shelf to suit the course in organic microtechniques admirably. When not in use, the shelf is covered by a sliding board and occupies a space of only 20 × 25 cm. One filling of the vials provides enough chemicals for four to five sessions. Liquid reagents are kept in 30-ml bottles with droppers.

In Fig. 3 are shown the universal microheating stage[12] and the melting point block. The inclined microscope keeps the heat away from the face of the operator. These apparatus and a centrifuge are shared by three to four students.

The equipment for adsorption chromatography and ion exchange

are shown in Fig. 4. The student makes the simple columns; the ground-joint apparatus is issued to him.

Fig. 2. Chemicals and Solutions

Fig. 3. Heating Stage and Melting Point Block

The equipment for paper chromatography is shown in Fig. 5. The student practises one-dimensional chromatography on the paper strip

and paper disk and two-dimensional work in the rectangular aquarium. Selection of the solvent system is done in the test tubes. The paper

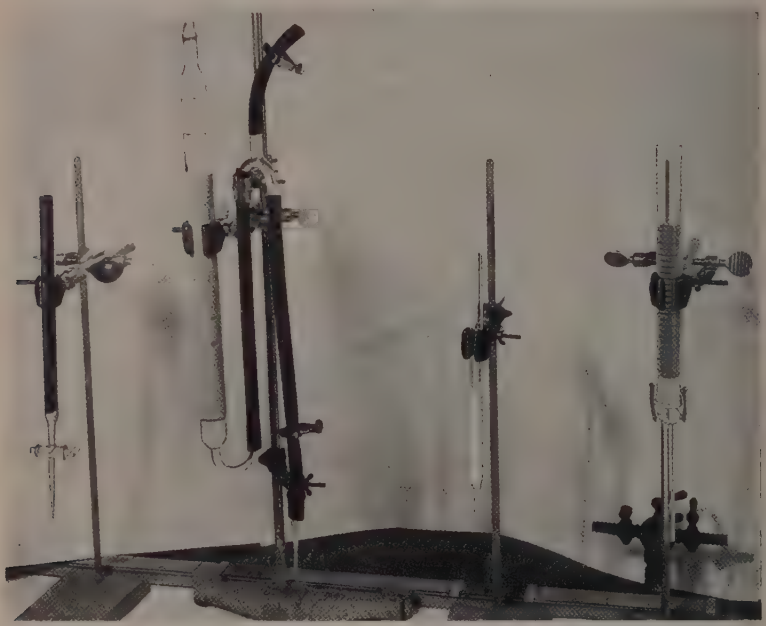


Fig. 4. Equipment for Adsorption Chromatography and Ion Exchange

equilibrated with the vapor of the solvent, the copper wire is pushed downward so that the lower edge of the paper strip is immersed in the solvent.

During the last four periods of the practical work each student is assigned a problem to which he can apply the microtechniques he has acquired. The problem may involve microseparation and identification of natural products, measurement of physical constants using the polarizing microscope and the *Kofler* heating stage, or microsynthesis in chamber with controlled atmosphere. The chamber, Fig. 6, is provided with a drier as well as exhaust and inlet blowers, and it has a working area of 50 × 85 cm. It is also suitable for work with radioactive materials as well as for microtitrations in an inert atmosphere.

It is possible to introduce a course in organic microtechniques with very little cost. The inexpensive apparatus in the student kit (Fig. 1), strip is held in position by a paper clip which hangs on the hook made from a copper wire. When the paper containing the sample has been

a small centrifuge, as glass jar and an aquarium comprise all the equipment required. The heating blocks may be conveniently made from metal rod and may be heated with gas.

Quantitative Organic Microanalysis

This course also runs through the semester and meets once a week. The postgraduate curriculum is so arranged that the two courses in organic microchemistry are offered in alternate semesters, and the student

Fig. 5. Equipment for Paper Partition Chromatography

is advised to take the course in general microtechniques before quantitative microanalysis.

The Practical Work. — The laboratory schedule is shown in Table 2. Four microbalances and two semimicro balances are reserved for class use and the laboratory is equipped with duplicate sets of apparatus for the experiments 2 to 8. We limit the number of students to six in a section so that each student can perform his assignment without interference from the rest of the group. The first eight periods cover the fundamental techniques which the student is expected to learn. The instructor demonstrates the technique to the group, and the students carry out the determination and complete the analysis on the same day. This schedule is different from that recommended by *Niederl* and *Niederl*[1], which allows three periods for micro-Dumas nitrogen and four for carbon and hydrogen. We have found that by using pure solid carbon dioxide as a source for the gas, the gasometer for controlling the volume of carbon dioxide may by eliminated and the student is able to learn

Table 2. Laboratory Schedule for Quantitative Organic Microanalysis

Period	Assignment
1	Use of micro- and semimicro balance, determination of sensitivity, calibration of weights.
2	Determination of metals in the crucible and in the microboat.
3	Determination of carboxyl group; micro-Kjeldahl method.
4	Micro-Dumas procedure for nitrogen.
5	Molecular weight by micro-Rast method.
6	Determination of carbon and hydrogen.
7	Micro-Carius technique for halogen or sulfur.
8	Determination of alkoxyl group.
9—14	Analysis of research samples; other methods of microanalysis.

the micro-Dumas technique in one period. We have also observed that omission of the wiping of the absorption tubes before the final weighing

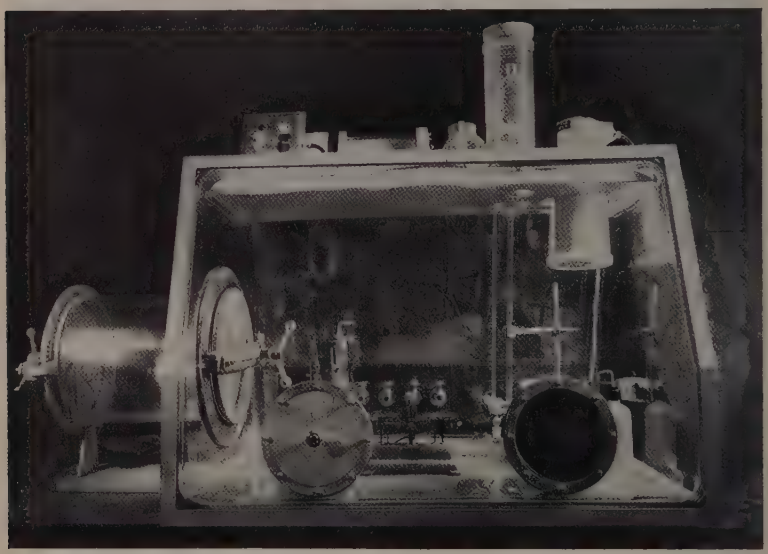


Fig. 6. Chamber with Controlled Atmosphere

greatly simplifies the training process without sacrificing precision and accuracy. In this way each student completes at least one determination in the sixth period, and it is later given the opportunity of spending an entire day on carbon and hydrogen determinations. For the first eight periods the student analyzes only compounds of known composition.

Beginning with the ninth period, after the student has acquired more skill, research samples are assigned to him. He is to choose the proper method for the determination of element or group and to perform the task under the supervision of the instructor. As a rule the students find this arrangement less tedious and more interesting.

The Lectures. — The syllabus of the course is listed below:

1. Microbalances and Microweighing. — Construction, types of balances, weighing techniques.
2. Introduction to Gravimetric Methods. — Determination of metallic constituents.
3. Introduction to Volumetric Methods. — Conversion from macro- to microtitration, carboxyl group.
4. Determination of Nitrogen. — Kjeldahl, Dumas, ter Meulen methods.
5. Determination of Molecular Weight. — Vaporimetric, ebullioscopic, cryoscopic, isopiestic methods.
6. Determination of Carbon, Hydrogen and Oxygen. — Dry combustion, wet combustion, problems in oxygen analysis.
7. Determination of Sulfur and Halogens. — Carius, catalytic, potassium fusion method, separation of halogens, special methods for fluorine.
8. Determination of Arsenic and Phosphorus. — Gravimetric, colorimetric.
9. Functional Groups by Titrimetry. — Acids, bases, and salts, hydroxyl, carbonyl, esters, amides, sulfur groups.
10. Functional Groups Involving Special Apparatus. — Alkoxyl, acyl, active hydrogen, unsaturated linkages.
11. Functional Groups by Physical Methods. — Spectrophotometry.
12. Organization of the Microanalytical Laboratory. — Equipment, arrangement, interpretation of microanalytical data.

The lecture schedule is arranged as follows. Each of the first eight lectures consists of a thorough discussion of the principle underlying the method to be practiced that day and a critical comparison with other methods. In the second half of the course, the various functional groups are treated. Emphasis is on the use of the determination of functional groups for the proof of molecular structure. The student is trained to interpret the result of a determination and is constantly reminded of the fact that there is no universal method which is applicable to all types of organic compounds.

The textbook by *Niederl* and *Niederl*[1] is used in this course and supplementary readings are suggested. The student is referred to the book by *Steyermark*[13] for industrial laboratory practice, and to *Pregl-Grant*[14]

and *Houben-Weyl*[15] for prevailing methods used in the European laboratories. Reading assignments on functional group analysis are selected from *Siggia*[16], *Wild*[17] and the "Organic Analysis" series[18].

The object of this course is two-fold: to give the organic chemist a clear understanding of the quantitative methods and to teach the analytical chemist microanalytical techniques without ignoring the chemistry involved. Graduates who are analytically inclined will be competent to organize a microanalytical laboratory, supervise technicians for routine work and develop new methods as the situation arises. On the other hand, the organic research chemist, who accounts for a large proportion of the students taking this course in recent years, probably will never have to perform microanalyses after he has received his Ph. D. degree, but he can apply the knowledge to great advantage. He is aware of the limitations and applications of the analytical methods, and he will be able to select the element or group to be determined. He is thus able to intelligently interpret the results and thus expedite the solution of his research problems.

Summary

The recent trend in organic microchemical training is discussed. A new course in general organic microtechniques has been added to the postgraduate curriculum at New York University for the benefit of the organic research chemist who has to work with minute quantities of material. The course includes both the classical *Emich* techniques and the modern methods of micro separation, identification, and synthesis.

A modified syllabus for quantitative organic micro analysis is presented. The student learns the fundamental techniques in the first half of the course and analyzes research samples in the second half. More emphasis is given to the determination of functional groups and the interpretation of the analytical results.

Zusammenfassung

Die derzeitige Richtung der Ausbildung in organischer Mikrochemie wird besprochen. An der New York University wurde ein neuer Kurs für allgemeine organische Mikromethoden in das Postbaccalaureat-Unterrichtsprogramm für jene Laboratoriumschemiker auf dem organischen Gebiet eingefügt, die mit kleinen Materialmengen arbeiten müssen. Dieser Kurs berücksichtigt die klassischen Verfahren von *Emich* und auch die modernen Methoden zur Trennung, Erkennung und Darstellung.

Ein abgeänderter Lehrplan in quantitativer organischer Elementaranalyse wird beschrieben. Die Studenten lernen die grundlegenden Arbeitsverfahren in der ersten Halbzeit des Kurses und beschäftigen sich in der zweiten Halbzeit mit der Analyse von in der organischen Forschung erhaltenen Stoffen. Erhöhter Nachdruck wird auf die Bestimmung funktioneller Gruppen und die Auslegung und Auswertung der Analysenresultate gelegt.

Résumé

Discussion des tendances actuelles relatives à la formation des microchimistes. Un cours nouveau concernant les microtechniques organiques générales a été ajouté au programme des «postgraduates» de l'université de New-York; il est destiné au chimiste organicien de recherches qui doit travailler avec de très faibles quantités de substances. Le cours comprend à la fois les techniques classiques d'*Emich* et les méthodes modernes de séparation, identification et synthèse à l'échelle microchimique. On présente un programme modifié de microanalyse organique quantitative. Dans la première partie du cours, l'étudiant apprend les techniques fondamentales et dans la seconde partie, il analyse des échantillons de recherche. On insiste particulièrement sur la détermination des groupements fonctionnels et sur l'interprétation des résultats analytiques.

Literature

[1] *J. B. Niederl* and *V. Niederl*, Micromethods of Quantitative Organic Analysis, 2nd ed., New York: Wiley. 1942.

[2] *A. A. Benedetti-Pichler*, Introduction to the Microtechnique of Inorganic Analysis, New York: Wiley. 1942.

[3] *J. A. Kuck*, Mikrochem. **36/37**, 54 (1951).

[4] *N. D. Cheronis*, Micro and Semimicro Methods, New York: Interscience. 1954.

[5] *F. Feigl*, Spot Tests, vol. 2. Amsterdam: Elsevier. 1954.

[6] *L. Kofler* and *A. Kofler*, Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Wagner. 1948.

[7] *F. Schneider*, Organic Qualitative Microanalysis. New York: Wiley. 1946.

[8] *T. I. Williams*, An Introduction to Chromatography, London: Blackie 1946.

[9] *E. M. Chamot* and *C. W. Mason*, Handbook of Chemical Microscopy, vol. 1, 2nd ed. New York: Wiley. 1940.

[10] *H. Lieb* and *W. Schöniger*, Anleitung zur Darstellung organischer Präparate mit kleinen Substanzmengen. Wien: Springer-Verlag. 1950.

[11] *R. J. Block*, *R. Le Strange* and *G. Zweig*, Paper Chromatography. New York: Academic Press. 1952.

[12] *T. S. Ma* and *R. T. E. Schenck*, Mikrochem. **40**, 245 (1953).

[13] *Al Steyermark*, Quantitative Organic Microanalysis. Philadelphia: Blakiston Co. 1951.

[14] *J. Grant*, Pregl's Quantitative Organic Microanalysis. London: Churchill. 1951.

[15] *Houben-Weyl*, Methoden der organischen Chemie, 4th ed., vol. 2, Analytische Methoden. Stuttgart: Thieme. 1953.

[16] *S. Siggia*, Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups, 2nd ed. New York: Wiley. 1954.

[17] *F. Wild*, Estimation of Organic Compounds. London: Cambridge University Press. 1953.

[18] *J. Mitchell* (ed.), Organic Analysis, vols. 1 and 2. New York: Interscience. 1953.

Brooklyn College, Brooklyn 10, N. Y.

The Use of Microtechniques in the Teaching of Chemistry

By

Nicholas D. Cheronis

With 9 Figures

(Received March 1, 1955)

The present paper deals with the general topic of the use of microtechniques in the teaching of chemistry. However, it will be largely restricted to the use of micromethods in the teaching of organic chemistry at both undergraduate and graduate college levels, the field in which the author feels competent to express himself on the basis of experience. Nevertheless, an inquiry will first be made into the philosophy of these methods of teaching, and second, a brief survey will be made of the extent to which the methods are used in the United States.

The Philosophy of the Use of Microtechniques in Chemistry

In the author's opinion there are two general objectives. One is the introduction of microtechniques for the explicit purpose of training a microchemist—that is, a specialist who can experiment in any field of chemistry with quantities of material as small as one microgram or less. The other is that introduction of microtechniques is of advantage in all courses of chemistry, beginning with the high school and including all the standard courses of the undergraduate curriculum. It is in this latter that I and my associates have been interested for a number of years. Therefore the educational objectives of all chemical experimentation will be examined to show how micromethods offer *definite advantages* over traditional methods in their achievement.

The fundamental reason for laboratories in which students perform experiments is that chemical facts and principles are mastered in a better manner by doing than by reading about them or by seeing the teacher demonstrate. This is such a universal truth about learning processes in

general that it does not require much elaboration. Even in the so-called chemistry course for non-science students which can be presented entirely by means of demonstration experiments by the lecturer, it can easily be shown that the student understands more of the properties and changes of the materials if he actually handles these materials and becomes the initiator of the changes at close range. Chemical experimentation by young students became prevalent in the more prosperous countries at the beginning of the century. However, as is well known, the methods which were introduced in colleges and high schools were the so-called macro methods involving large apparatus, flasks, condensers and beakers. Yet, as *C. L. Wilson* has pointed out[1] the application of small scale experimentation in the teaching of chemistry was considered and tried over 100 years ago, much earlier than is thought by even the most ardent supporters of these methods for laboratory instruction. It appears that *D. R. Reid* in giving evidence before the Select Committee on Education in Ireland, in 1835, recommended the use of small-scale experimentation for science teaching in schools. His students obtained a blowpipe, a test tube, slips of paper, and broad and narrow strips of glass such as the glazier discards. The microscope was used when necessary. Tests were performed on paper and on glass slides; the latter were also employed for evaporation and heating. "Every school master might provide himself with apparatus sufficient to show thousands of experiments on a small scale."

In spite of sporadic proposals for small-scale experimentation, instruction in chemistry followed the traditional pattern—the teacher employed the same methods and techniques in transmitting knowledge that were used in his own instruction. However, beginning with about 1910 the impact of the development of microchemical techniques in Austria and also the effects of the first World War demanding economy of materials and time forced many teachers to reexamine the traditional methods.

In this process many teachers found that small-scale experimentation offers a number of definite advantages. The most important of these is the saving of time and materials. In addition the student acquires superior habits of care, cleanliness, and manipulative skill from his experience in working with small quantities. A further advantage is the small initial investment for equipment. Even in a wealthy country as the United States, this is of considerable importance because of the large number of students in high schools who are given individual laboratory practice. Moreover, less breakage and upkeep result from this type of instruction and reduction in the seriousness of possible accidents is not an inconsiderable item.

By 1940 small-scale experimentation had a notable success in the

teaching of qualitative analysis at the college level. The scale of experimentation was intermediate between the so-called micro and macro methods, and has been called *semimicro*. The term became entrenched despite the charge of cacophony from some microchemists. However, the topic of terminology will be discussed later. For the present it should be pointed out that the shift to an intermediate scale between the micro and macro scales was primarily due, at least in the United States, to the fact that many of the teachers were inexperienced in micromethods, since they had no training in microchemistry and obtained discouraging results with milligram quantities.

Small scale experimentation for the teaching of organic chemistry, in the experience of the author, is based on the premise that the introduction of the student to the use of micromethods should be gradual. The teaching of elementary organic chemistry should begin with preparation of semimicro quantities of about 1 to 2 grams. We worked out the first methods by 1933/34[2] so that the amounts of substances could be reduced to 100 to 200 mg. After six months or a year the student undertakes the preparation of derivatives in the identification of organic compounds usually called "Qualitative Organic Analysis[3]". In the same course the student learns the use of 10 to 25 mg of substance in the detection of functional groups. Thus he is ready for milligram scale experimentation at the end of one or one and a half years. This scale of experimentation is attained in (*a*) Advanced Organic Preparations, (*b*) Quantitative Determination of Functional Groups, (*c*) Elementary Organic Analysis, (*d*) Chemical Microscopy.

If the need for economy has been one of the factors for the introduction of small-scale experimentation in America, a wealthy country, how much greater is the necessity in other countries which are not so fortunate? I can only judge from inquiries from all parts of the world, Egypt, Iran, Afgan, etc.

Another reason for the increased popularity of micromethods in the United States is their adoption by industrial laboratories. The increased amount of exploratory work in industrial research and the wide application of micromethods in biochemical research has led to the wider use of micropreparative and microanalytical methods. Finally, organic syntheses with isotopes and all of the experimentation with radioactive elements and compounds have rendered the use of micromethods inavoidable because of the scarcity, cost and dangerous nature of most radioactive elements.

There are no data as to the extent of the application of microtechniques in the teaching of chemistry. A rough approximation is obtained through the sale of laboratory textbooks which give instruction in such methods. Based on such a criterion is an estimate shown in Table I.

Table 1. Extent of Application of Microtechniques in the Teaching of Chemistry in the United States*

Subject	Per Cent of Total
High School Chemistry	0.1— 0.2
General Chemistry—(College)	0.3— 0.5
Inorganic Qualitative Analysis—(College)	80 —85
Organic Qualitative Analysis—(College)	15 —20
Preparative Organic Chemistry—(College Graduate)	20 —25

* Estimate based on sale of texts dealing with microtechniques.

It is interesting that the most notable success is in the field of inorganic qualitative analysis. This was brought about by the appearance of two textbooks between 1933 and 1935 and the willingness of a laboratory supply dealer to develop and advertise the apparatus and equipment to teach this type of course.

The use of microchemical preparative methods has lagged behind the analytical procedures. For example, the micromethods of quantitative organic analysis developed by *Pregl* gained wide acceptance in the decade following World War I. In the United States, between 1920 and 1930, a few colleges and universities added microanalytical laboratories to their chemistry departments. In most cases, however, the microanalytical laboratories remained within the domain of the "Organic Division" and performed routine elementary analyses for research workers in organic chemistry. With few exceptions, the attitude of the leaders in organic chemistry toward the use of microtechniques for teaching has varied from negative to hostile. In the opinion of the author two reasons can account for this frame of reference. One is the tradition and orthodoxy which characterize most organic chemists as compared, for example, with physical chemists. Not only in laboratory techniques, but also in the field of theories they may be likened to the successful well-to-do business men who "rightly" believe in no change and in the "status quo". The organic chemists really held the center of the chemical "stage" between 1880 and 1940, and only recently have been displaced by the rising physical and nuclear chemists.

The application of the electron structure of the atom to organic chemistry can be cited as an example of adherence to orthodoxy and reluctance to change by organic chemists. *G. N. Lewis*[4] published his theory of the electronic structure of the atom by 1916. This electronic theory was rapidly adopted in the teaching of general, inorganic and analytical chemistry. A notable attempt to apply the electron theory to the facts and theories of organic chemistry was made by *Stieglitz*[5],

Fry[5], and a few others between 1910 and 1925. However, these so-called "electronic frills" won few adherents. By and large the teaching and publications of organic chemistry between 1920 and 1940 retained the "dash-bond" system. But the new ideas were taken up by the English school, most notably by groups under *Ingold*[6] and *Robinson*[7] and developed in more precise theories of organic reactions. Clothed with the new raiments of "electrophilic" and "nucleophilic" the electronic theories were reintroduced in the United States between 1940 and 1950, so that today the "dash-bond" system has almost completely changed to the "dot-bond" system.

The organic chemists by their success in the synthesis of new compounds and development of new products attracted the better students who in turn went out into a rapidly expanding technological society to become leaders in industry. Thus, subconsciously at least, they became steeped in orthodoxy and unwilling to experiment with new approaches and new heresies. If the methods give rise to good products, why change them? A beginner brought up to consider the orthodox quantity of an organic preparation as 25 to 100 g will very likely attempt to synthesize new organic compounds in similar quantities.

The second important reason for the reluctance of organic chemists to adopt micromethods in teaching or in the practice of organic chemistry is that the first methods proposed for preparative organic chemistry were on the milligram scale. Consequently, the few dissenters and heretics among the organic chemists who tried them in teaching, obtained discouraging results because they themselves had no previous training in micromethods. It might be pointed out that the author belongs to the category of those who acquired micromethods by "self-application" and slow development and that this was the impelling reason for the philosophy that the use of microtechniques in the teaching of chemistry offers tremendous advantages over the traditional methods; also that their introduction and the diminution of quantities in experimentation should be gradual.

Terminology

Before taking up a brief descriptive review of the use of microtechniques in the teaching of chemistry, a brief discussion of the terminology employed in the use of these methods is in order.

Considerable confusion exists in the area of designating the quantities involved in small-scale experimentation. The early proposals by *Emich*[8], *Benedetti-Pichler*[9], and other European microchemists for a logical terminology to classify microchemical experimentation as *centigram*, *milligram* and *microgram* procedures were not widely adopted. Instead, the terms *macro*, *semimicro*, *micro* and *ultramicro* became popular, particularly in

America. *Pregl's* original methods for organic microanalysis were designed for a quantity of a few milligrams; the amounts used were as high as 12 to 15 mg and as low as 3 to 5 mg; however, the term "microanalysis" usually denotes the use of a few milligrams. In 1939 the Division of Microchemistry of the American Chemical Society defined microanalysis as follows[10]: "Microanalysis consists of techniques whose primary purpose is the ascertaining of chemical composition where the quantities dealt with are not one tenth as large as in customary laboratory practice." According to this definition, work with 25 to 50 mg would fall within the micro scale, since the classic methods of elementary organic analysis usually require 0.2- to 0.5-g samples. However, in America the range of 10 to 25 mg for organic analysis is also designated as semimicro[11]. To avoid confusion the author proposed[12] that the definition of the terms *micro, semimicro* and *macro* should be related to the operation involved. that is, according to whether the objective is *analytical* or *preparative* in character. Table 2 represents a summary of the proposed terminology. In the last column are listed the most recent recommendations of the Committee on Nomenclature, Division of Analytical Chemistry of the American Chemical Society[13], which, of course, do not include consideration at the usage of the terms for preparative work.

Table 2. Proposed Terminology for Small-Scale Experimentation

Objective: Preparative		Objective: Analytical	
Term	Range of Quantities in mg	Range of Quantities in mg	
		(Author 1949)	(ACS Recommendation 1952)
Ultramicro.....	—	—	0.1 or less
Micro	1—50	0.1—10	0.1—10
Semimicro	100—2000	10 —25	10 to less than 100
Macro	10—100	100 or more	100 or more

The matter of terminology, though it is important, is not one that is not subject to revision. It is true that the terms "ultramicro", "micro", "semimicro", and "macro" lack in precision, and it would have been better if the terms *microgram, milligram, centigram* procedure had been adopted. The Microchemical Congress has a duty to discuss this matter and make proposals. The survey of the application of microtechniques to the teaching of chemistry can now be made.

Application to the Teaching of Organic Chemistry

The numbered courses in Table 3 are those with which the author has had experience in organizing and teaching. The unnumbered course is too

well known to require any description. The discussion will be restricted to the first three courses, since Functional Group Analysis will be described at another time in collaboration with Dr. *T. S. Ma* who has undertaken the work initiated by the author in 1950—1951.

Table 3. Use of Micromethods in the Teaching of Organic Chemistry

Course and Subject	Duration in weeks	Hrs of Lab per week	Type of Work and Scale of Quantities
(1) Introductory Organic Chemistry	30	4—6	Preparative Semimicro 100—2000 mg
(2) Qualitative Organic Analysis	15	4—6	Analytical and Preparative. Mostly 10—200 mg. Some 1—100 mg
(3) Advanced Organic Preparations	15	7—8	50% Macro 50—100 g 25—40% Semimicro 50—200 mg 25—40% Micro 1—10 mg
(4) Functional Group	15	7—8	5—15 mg
Quantitative Elementary Analysis	15	7—8	0.5—10 mg

The first detailed procedures for Introductory Organic Chemistry were worked out between 1934 and 1936 and were first published in mimeographed form, then under the title "Semimicro and Macro Organic Chemistry[14]" in book form[2]. The work has been undergoing revision for two years and the new edition is expected next year. The content of a year's work is summarized in Table 4.

Table 4. Content of Laboratory Work in Elementary Organic Chemistry Using Micromethods (120 hours)

Group I

Procedures	Range of Quantities
1. Purification by crystallization	500 mg
2. Purification by distillation	5 ml
3. Fractional distillation	10 ml
4. Determination of melting points	1—3 mg
5. Determination of boiling points	40—100 μl
6. Determination of refractive indices	200 μl
7. Identification of elements	1—25 mg

A glance at the table indicates that the assignment is very large. With large equipment and macro procedures the average student normally completes 4 of the 7 introductory experiments and about 12 preparations in Group II, and about 2 experiments of Group III. Using the micro-

methods, the average student is able to complete all of the experiments in Groups I and III and 24 preparations (Group II).

Group II

Preparations	Range of Quantities
1. n-Decane or n-Octane	1—2.5 g
2. Cyclohexene	2—3 g
3. n-Butyl bromide	2—3 g
4. ter-Butyl chloride	1—1.5 g
5. Methyl iodide	2—4 g
6. Ethyldimethyl carbinol	2—3 g
7. Aniline	1—1.5 g
8. Cyclopentanone	1—1.5 g
9. Benzoic or Phenylacetic acid	1—1.5 g
10. Ethyl acetate	1—1.5 g
11. Benzoyl chloride	500 mg
12. Benzoyl o-toluidide	500 mg
13. α-Bromopropionic acid	2 g
14. Alanine	500 mg
15. m-Dinitrobenzene	50 mg
16. 2.4.6-Tribromoaniline	50 mg
17. Iodobenzene	1—2 g
18. o-Chlorobenzoic acid	1 g
19. Phenylhydrazine hydrochloride	1—1.5 g
20. 2.4-Dihydroxyazobenzene	500 mg
21. Benzene-azo-β-naphthol	1 g
22. 1-Amino-2-naphthol hydrochloride	500 mg
23. Sulfanilic acid	500 mg
24. Naphthoquinone	500 mg
25. Triphenylmethyl chloride	1—2 g
26. Anthraquinone	1—2 g
27. Quinoline	1—2 g
28. Sulfanilamide	500 mg

Group III

Experiments in the Study of Properties	Range of Quantities, mg
1. Properties of hydrocarbons	100
2. Properties of halogen compounds	100
3. Reactions of hydroxy compounds*	100
4. Reactions of amines	50
5. Reactions of carbonyl compounds	50
6. Properties of carboxylic acids*	100
7. Properties of carbohydrates and proteins	—

* An unknown alcohol and an unknown carboxylic acid for identification are included in these experiments.

In order to illustrate the time involved between the two types of methods, two examples will be cited. The first involves the separation of a mixture of methanol-water or carbon tetrachloride-toluene. The macro procedure involves the separation of 100 ml and requires with

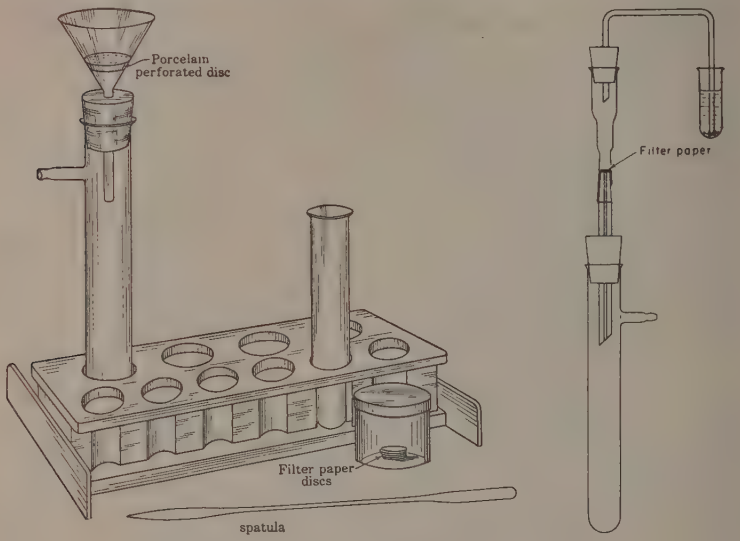


Fig. 1. Apparatus for Filtration of Semimicro Quantities

the assembling and disassembling of the apparatus 3 to 4 hours, while the semimicro procedure employs 10 ml of the mixture and requires 1 to 1.5 hours. The second example involves the preparation of benzoic acid by carbonation of phenylmagnesium bromide. In the macro procedure, 0.25 to 0.3 moles of the reagents are employed, while in the semimicro, the quantities are 0.02 moles. The time required for the larger quantities is double, or more, that for the smaller quantity. The larger quantity requires a three-neck flask and a stirrer, the smaller quantity an 8-inch test tube and no stirrer.

These two examples illustrate the saving of time. Since the primary objectives in the laboratory work are the acquisition of techniques and facts and the demonstration of important group reactions and principles. none of these is sacrificed by the reduction of the quantities to a tenth. Many students who take organic chemistry do not become chemists. The argument that the student must learn techniques which will enable him to prepare 100 grams or a kilo of an organic compound is only valid for the future chemist and a provision is made for such a student, to

acquaint him with large apparatus, as will be shown in the subsequent discussion. However, for students who take the introductory course a great amounts of time and materials are saved. Of the two, time is the more important since the student is freed for acquisition of more knowledge.

Fig. 1, 2, 3, 4 and 5 show typical setups used by students for

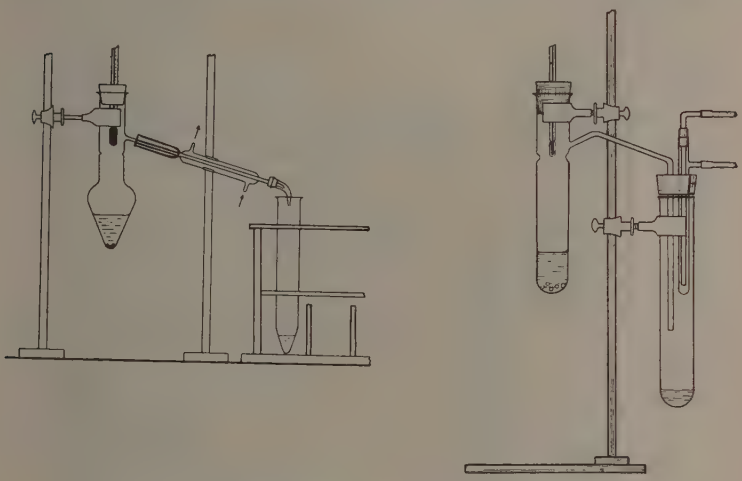


Fig. 2. Two Types of Student Apparatus for Simple Distillation

filtration and for distillation, whether fractional, steam or vacuum. The cost of the apparatus is about one half to one third that of the corresponding macroapparatus.

Table 5. Content of Laboratory Work in Qualitative Organic Analysis Using Micromethods (60 hours)

Group I

Preliminary Work With Known Substances	Range of Quantities, mg
1. Purification of solids	100—200
2. Purification of liquids	2—5
3. Test for elements	0.5—10
4. Solubility tests	5—15
5. Functional group tests	10—25
6. Preparation of derivatives	25—100
7. Fusion techniques	2—5

Group II.

1. Identification of about 8 unknown organic compounds, ranging gradually from the simpler to the more complex. For most relatively pure compounds 500 to 600 mg are given as a sample. For some (ethers, esters, etc.) the sample is 1 to 2 ml.
2. Separation and identification of the components of one or two unknown mixtures.
3. Chromatographic separation of a 2- or 3-component mixture*.

Table 5 shows the content of the laboratory work in Qualitative Organic Analysis.

The procedures were developed in collaboration with Dr. *John B. Entrikin* of Centenary College of Louisiana (Shreveport, Louisiana)

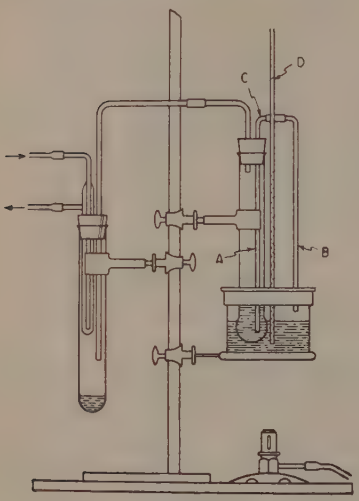


Fig. 3. Student Apparatus for Steam Distillation

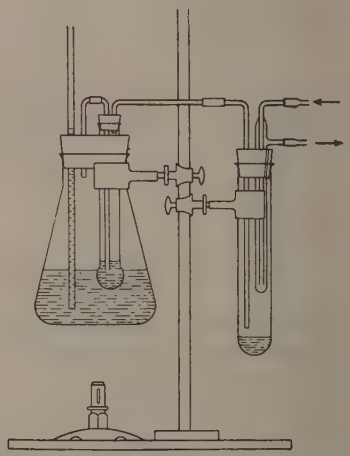


Fig. 4. Student Apparatus for Steam Distillation of Very Small Quantities of Liquid

and published in book form in 1947[3]. It is superfluous to enter into a detailed discussion of the advantages of the microtechniques as applied to analytical work. However, one example will suffice to illustrate the development of superior habits in care, cleanliness and manipulative skill through experience with micromethods. An unknown which has been tentatively identified on the basis of one or two constants, solubility and functional group tests, still requires as final criteria of acceptance or rejection of the identification, the melting points of the purified deriv-

* This is a recent addition.

atives. In the macromethods described in the literature 1 to 5 grams of the derivative are usually prepared. With such amounts even a careless worker can perform 2 to 3 crystallizations and still have 100 mg of the derivative for melting point determinations. However, with reduction

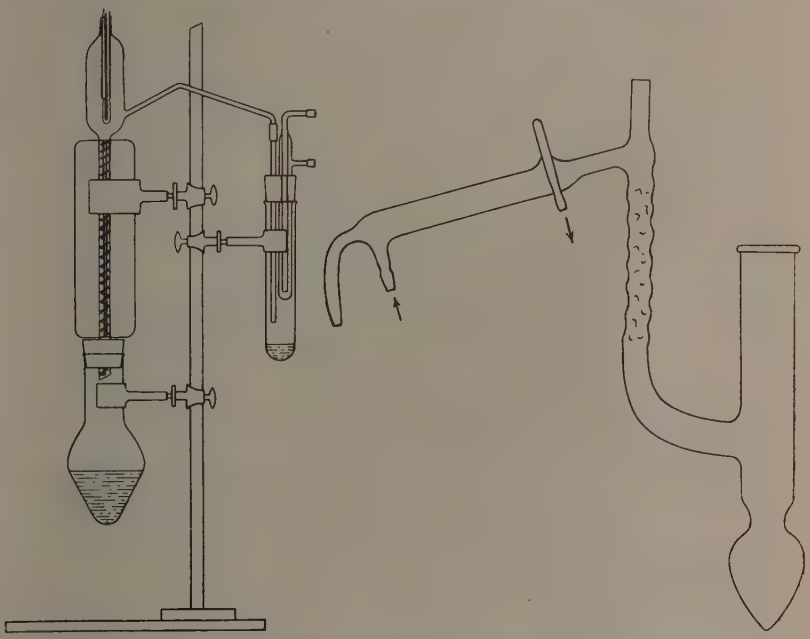


Fig. 5. Student Apparatus for Fractionation

of the amounts of the reactants to one tenth or less, great care must be exercised; conditions must be chosen which will insure completion of the reaction, and a minimum number of crystallizations must be performed, in order to obtain the few milligrams of the pure product sufficient for several melting point determinations.

The course in Qualitative Organic Analysis is primarily for the training of chemists, although those who go into biology have found it very profitable for two reasons. First, it is an excellent review of the reactions of the various groups of organic compounds; second, it involves the application of knowledge to the solution of a problem, a positive contribution to training in reflective thinking in problems involving the identification of materials which the biologist encounters. It should also be noted that there is less reluctance by even the orthodox organic

chemists toward employment of micromethods in analytical work than in the preparative field.

The apparatus employed in this course is not much different than those employed in the elementary course and has been described in detail in the works already cited. The apparatus shown in Fig. 6 is employed for the preparation of derivatives on a milligram or microgram scale. In derivatizing microquantities of an aldehyde, the "well" of the condenser is charged with a solution of methone or one of the substituted hydrazines, and the solution containing the aldehyde is introduced through the side arm. The stopcock is then closed and the vessel is gently warmed for several hours. The carbonyl compound volatilizes and reacts with the reagent in the well. Similarly, in derivatizing microquantities of a carboxylic acid, the well is charged with water, a solution of anethole or p-toluidine or other suitable reagent. The vessel is charged with the dry salt of the carboxylic acid and thionyl chloride. The vessel is warmed to volatilize the acid chloride which condenses in the well and reacts.

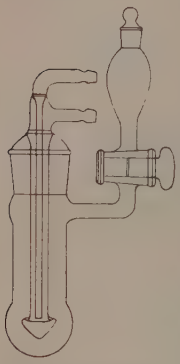


Fig. 6. Microapparatus for Preparation of Microgram Quantities of Derivatives. May Also Be Used for Detection of Gases

Turning to the last course, Advanced Organic Preparations, it should be stated that its primary objective is to acquaint the student with some of the more important methods which are employed in the synthesis of organic compounds. The course consists of one hour of discussion of reactions, about a halfhour's discussion of techniques and the balance of 6 to 8 hours is devoted to the preparations assigned. This type of course is very old and to the knowledge of the author, macroquantities have always been employed at least in the United States. As previously stated, there is ample justification for this practice, since the training of an organic chemist involves not only learning the reactions by which chemical compounds may be synthesized, but the ability to carry them out in practice. It is reasonable to expect a practicing organic chemist to be able to synthesize 50 to 500 g of a compound which has been described in the literature. However, such a chemist should also be able to synthesize, if the necessity arises, a few hundred mg and even much less of a compound. Therefore, about two years ago experimentation was initiated with the course in Advanced Organic Preparations, in order to introduce some work with micromethods. It should be noted that it is given at the graduate level and most of the students have had little or no training in micromethods. The content of the discussion and demonstration is given in Table 6.

Table 6. Content of Discussion and Demonstrations in Advanced Organic Preparations Which Include Macro, Semimicro and Microtechniques

Week	Discussion		Demonstrations
	Reactions	Techniques	
1.	Problems involved in organic syntheses; literature search; nomenclature	Safety rules; cleaning and drying	(a) Semimicro Grignard reagent preparation (b) Vacuum system (c) Heating, stirring
2.	Use of organometallic reagents	Distillation: vacuum and atmospheric	Micro and macro vacuum distillation
3.	Halogenation of organic compounds	Melting points; refractive indices	(a) Micro m.p. apparatus (b) Fusion techniques
4.	Reduction of organic compounds	Boiling points molecular weights	(a) Micro-hydrogenation (b) Macrohydrogenation
5.	Carbonyl condensations	Heating and cooling; absorption of gases	Magnetic stirrers
6.	Oxidation of organic compounds	Removal of solvents	Measurement of small volumes
7.	Amination and diazotization	Steam distillation	None
8.	Examination	Crystallization	Microcrystallization
9.	Acylation and alkylation	Sublimation molecular distillation	(a) Milligram synthesis (b) Microsublimation
10.	Esterification and hydrolysis	Filtration and crystallization	None
11.	Dehydration	Fractional distillation	None
12.	Cyclization	Extraction	Liquid-liquid and liquid-solid extractions
13.	Stepwise synthesis and degradation	Chromatography and ion exchange	(a) Paper chromatography (b) Column chromatography
14.	Isotope synthesis		

The most important part of the work is the laboratory assignment to the student. Generally each student is assigned eight to ten preparations which illustrate important synthetic methods. Table 7 gives a summary of the assignments to two students.

Table 7. Compounds Assigned for Preparation in Advanced Synthetic Organic Chemistry Including Macro, Semimicro and Micro Techniques

	Compounds Assigned for Preparation		Scale of Preparation	Reaction Illustrated
	Student A	Student B		
1.	Dimethyl-n-butyl carbinol	Methyl isopropyl carbinol	Semimicro	Use of Grignard reagents
2.	o-Phthalaldehyde	1.5-Dibromo-pentane	Macro	Halogenation
3.	β, γ-Benztropolone	α-Methylcinnamic acid	Macro	Carbonyl condensation
4.	β-Phenylethylamine	1.4-Cyclohexanediol	Macro	Catalytic hydrogenation
5.	p-Aminophenol	Piperonyl alcohol	Semimicro	Catalytic hydrogenation
6.	β-Benzoylacrylic acid	1.4-Dibenzoyl-butane	Macro	Acylation by Friedel-Crafts method
7.	dl-N-acetylnorvaline	α-Aminodecanoic	Macro	Use of malonic ester synthesis
8.	Diphenic acid	1,2-Aminonaphthol hydrochloride	Semimicro	Diazotization and coupling
9.	1,2,3-Benztriazole	1,2,3,4-Tetra-hydrocarbazole	Macro	Heterocyclic synthesis
10.	Thymol-α-naphthylurethan	3-Pentanone semicarbazone	Micro (milligram)	Derivatization and fractional sublimation

It will be noted that of the ten preparations assigned, six employ macroquantities; that is, the yield is between 25 and 100 g. Three preparations are in the range of 500 mg to 2 g, while one is in the range of 1 to 5 mg. The assignment is made on the basis of a number of criteria such as the relative ease of preparation, the presence of good working directions in the literature, the use of the maximum possible number of different types of apparatus and techniques.

Few students are able to finish ten preparations, most finish between six and eight. In general, practically all students completed two or

three preparations involving the use of micromethods. The interest shown justified continued experimentation.

Fig. 7, 8 and 9 show a few of the pieces of apparatus employed in this course. Fig. 7 represents an assembly for fractionation. The packing is either glass helices, or Podbielniak of Heli-Grid type. Fig. 8 shows the latest modification of the universal assembly, originally published in Mikrochemie[15]. Fig. 9 represents apparatus for the micropreparation of a Grignard reagent.

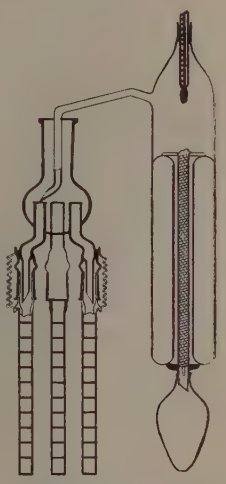


Fig. 7. Apparatus for Fractionation. Column 160 × 8 mm. Packing Either Glass Spiral or Podbielniak Heli-Grid Packing. Vacuum Jacket Attached to Column

The topic of teaching high school and introductory general chemistry at the college has been occupying our attention for the past 4 years. The progress which is being made will be reported at another time. However, it is believed that it is in this field that the advantages of small scale experimentation will have the greatest success, since their advantages will be brought to the attention of the future scientist at an early stage of training.

Summary

It was pointed out that although small scale experimentation, micromethods, and microtechniques were considered for teaching even at elementary level over 100 years ago, their adoption has been very slow, and to a very large extent they have remained in the realm of the specialist. Though it may appear strange at first sight that there should be reluctance to experiment with methods of teaching science, an area of knowledge whose very heart is continuous experimentation, a small amount of reflection will show that teaching methods are a part of the sum total of the complex called "*culture*" which changes only slowly over a period of centuries. There is a definite trend towards the adoption of these methods for teaching chemistry not only at the college level, but also at the intermediate educational level, not alone because of the saving of time and materials but also because micromethods impart superior disciplines.

Zusammenfassung

Die Verwendung von Mikromethoden beim Unterricht in organischer Chemie (Graduate und Undergraduate Niveau) wird besprochen. Sie kann zweierlei Ziele verfolgen: die Ausbildung von Mikrochemikern und die Verbesserung des Chemieunterrichtes im allgemeinen von der Mittelschule bis zur Hochschule. Die Ziele des Laboratoriumsunterrichtes und die Vor-

teile des Arbeitens im kleinen Maßstab werden kritisch besprochen. Die Umstände, die zu weitgehender Annahme von Mikromethoden in einigen

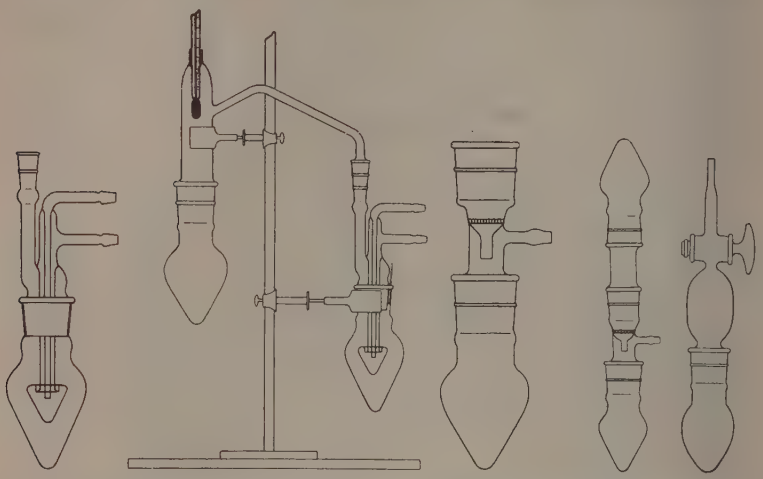


Fig. 8 *A* Fig. 8 *B* Fig. 8 *C* Fig. 8 *D* Fig. 8 *E*

Fig. 8. Universal Apparatus for Micropreparative Work. (*A*) Refluxing, (*B*) Distillation. (*C*) Filtration, (*D*) Crystallization and Filtration Without Transfer, (*E*) Separation

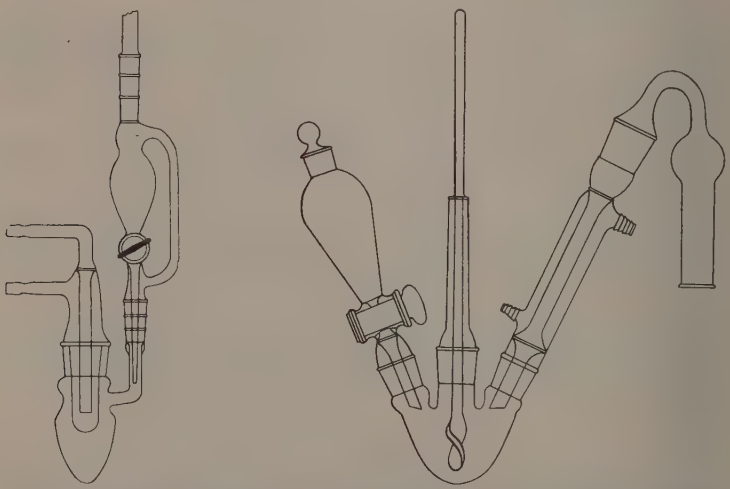


Fig. 9. Apparatus for Preparation of Organic Compounds. May Be Used for Grignard Reagents

Lehrgegenständen (z. B. qualitative Analyse) geführt haben, werden mit jenen verglichen, die eine breite Anwendung dieser Methoden in anderen

Lehrgegenständen (z. B. organischer präparativer Chemie) verhindert haben.

Die vom Verfasser während der letzten 25 Jahre zur Ausbildung in organischer Chemie entwickelten Unterrichtskurse werden eingehend beschrieben. Es wird bei diesen Kursen von dem Grundsatz ausgegangen, die Substanzmengen allmählich zu verkleinern: (a) Der Anfängerkurs umfaßt die üblichen Verfahren zur Herstellung von geeigneten Vertretern der wichtigsten Klassen organischer Verbindungen und das Studium ihrer Eigenschaften; hierzu werden Substanzmengen von 100 bis 2000 mg verwendet. (b) Der Kurs in qualitativer organischer Analyse umfaßt Fraktionierungsverfahren, Bestimmung von physikalischen Konstanten und Verfahren zur Klassifizierung unbekannter Substanzen und zur Darstellung von Derivaten derselben; die verwendeten Substanzmengen liegen zwischen 1 mg und 100 mg. (c) Im Kurs für Vorgeschrittene in organischer Synthese werden 50% der üblichen Versuche mit Mengen von 50 bis 100 g ausgeführt; 25% der Versuche wurden mit Substanzmengen von 50 bis 200 mg und die übrigen mit Substanzmengen von 0,5 bis 10 mg ausgeführt. Derartig ausgebildete Studenten können ohne Schwierigkeit in Mikroverfahren für die Bestimmung von funktionellen Gruppen oder für die quantitative Elementaranalyse unterwiesen werden. Apparate, wie sie in diesen Kursen benutzt werden, sind kurz beschrieben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Verwendung von Mikroverfahren im Unterricht das Interesse an experimenteller Arbeit erhöht. Abgesehen von Zeit- und Materialersparnis muß anerkannt werden, daß die Studenten zu größerer Sorgfalt, Reinlichkeit und manueller Geschicklichkeit erzogen werden.

Résumé

L'auteur fait un exposé sur l'introduction des microméthodes dans l'enseignement de la chimie organique (niveaux des «graduates» et des «undergraduates»); elle permet de poursuivre deux objectifs: la formation de microchimistes et l'amélioration de l'enseignement de la chimie, en général, depuis le lycée jusqu'à l'école supérieure. Le but que doit viser l'enseignement de laboratoire et les avantages du travail à petite échelle sont les objets d'une discussion critique. Les circonstances qui ont favorisé la diffusion étendue des microméthodes dans certains domaines d'enseignement (l'analyse qualitative, par exemple) sont comparées à celles qui ont au contraire contrecarré leur large extension dans d'autres domaines (celui de la chimie organique préparative, par exemple). Les cours professés par l'auteur pendant les 25 dernières années pour la formation de chimistes organiciens sont décrits en détails. Ils sont axés sur l'idée fondamentale de la diminution générale des quantités de substances mises en oeuvre et se subdivisent comme suit:

a) Le cours pour débutants qui comprend les techniques habituelles de préparation de substances appropriées représentant les classes de combinaisons organiques les plus importantes ainsi que l'étude de leurs propriétés. A cette fin on emploie des quantités de substance de 100 à 2000 mg.

b) Le cours d'analyse qualitative organique qui comprend les procédés de fractionnement, la détermination des constantes physiques et les méthodes de classification des substances inconnues et de préparation de leurs dérivés; les quantités de substances utilisées varient de 1 à 100 mg.

c) Le cours pour étudiants entraînés à la synthèse organique qui comporte 50% des travaux courants sur des quantités de 50 à 100 g de substance, 25% sur des quantités de 50 à 200 mg et 25% sur des quantités de 0,5 à 10 mg. Les étudiants formés de cette façon peuvent être mis au courant, sans diffi-

culté, des techniques microanalytiques de dosages fonctionnels ou élémentaires. Les appareils qui sont utilisés dans cet enseignement sont brièvement décrits.

En résumé, on peut dire que l'introduction des microméthodes dans l'enseignement, fait croître l'intérêt du travail expérimental. Indépendamment de l'économie de temps et de matériel, les étudiants sont d'autre part habitués à un plus grand soin, une plus grande propreté et une plus grande habileté manuelle.

Literature

[1] *C. L. Wilson*, Mikrochim. Acta [Wien] **1953**, 58.

[2] *N. D. Cheronis*, Laboratory Manual of Organic Chemistry. Chicago City College (Wright). 1935.

[3] *N. D. Cheronis* and *J. B. Entrikin*, Semimicro Qualitative Organic Analysis. New York: Crowell. 1947.

[4] *G. N. Lewis*, J. Amer. Chem. Soc. **38**, 762 (1916).

[5] *J. Stieglitz*, J. Amer. Chem. Soc. **23**, 797 (1907); **36**, 238 (1914); **38**, 2064 (1916). *H. S. Fry*, J. Amer. Chem. Soc. **34**, 667 (1912); **36**, 248 (1914); **38**, 1324 (1916).

[6] *C. K. Ingold*, Chem. Rev. **15**, 225 (1934).

[7] *R. Robinson*, Outline of an Electrochemical Theory of the Course of Organic Reactions. The Institute of Chemistry of Great Britain and Ireland. 1932.

[8] *F. Emich*, Mikrochemisches Praktikum. München: Bergmann. 1924. p. 1.

[9] *A. A. Benedetti-Pichler*, Introduction to the Microtechnique of Inorganic Analysis. New York: Wiley. 1942. p. 2.

[10] Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **11**, 111 (1939).

[11] *E. P. Clark*, Semimicro Quantitative Organic Analysis. New York: Academic Press. 1943.

[12] *N. D. Cheronis* and *M. Savoy*, Micro and Semimicro Techniques in Preparative and Analytical Hydrocarbon Chemistry. San Francisco Meeting, ACS, April, 1940. *N. D. Cheronis*, Micro and Semimicro Methods. New York: Interscience Publ. 1954. p. 8.

[13] Analyt. Chemistry **24**, 1348 (1952).

[14] *N. D. Cheronis*, Semimicro and Macro Organic Chemistry. New York: Crowell. 1942.

[15] *N. D. Cheronis* and *A. Vavoulis*, Mikrochem. **38**, 428 (1952).

27th MP Crime Laboratory, US Army, Frankfurt am Main, Germany

The Application of Microchemistry in Forensic Chemistry

By

Livio L. Vagnina

(Received February 11, 1955)

Physical evidence which may be defined as potential clues to be examined, identified, and evaluated toward the solution of a crime must of necessity often call upon microchemistry as a part of scientific investigation. The scientific examination of evidence in a crime detection laboratory is not for the purpose of securing a conviction, but is for the purpose of ascertaining truth. Since the forensic chemist will often find himself testifying before courts of law he proceeds with great care and caution. There is perhaps no other branch of chemistry which can train him better for legal proceedings than microchemistry. Let us define microchemistry as "uncommon" chemistry. Uncommon because of the minute amounts of material one is called upon to analyze and uncommon because of the highly specialized and refined techniques required in doing so. The purpose of this paper is to review briefly some of the micro-techniques used at the 27th Military Police Detachment Crime Laboratory, US Army in Europe.

Blood. At a crime laboratory a large percentage of the physical evidence to be examined requires the identification and analysis of dried blood stains as well as other body fluids. In order to confirm as fact that a substance is blood crystal tests known as the haemin, haemochromogen or *Teichmann*'s tests are used. All of the tests give characteristic crystals to be observed under the microscope. In many instances substances to be examined are barely visible to the naked eye. Once blood is established to be present the next application made is a micro-precipitin test. This can be conducted in fine capillary tubes to determine whether a blood stain is of human origin or not. The sensitivity of such a test is extremely high and has yielded definitely positive results for human

blood when a dilution of 1 to 20.000 of a thirty-secondth of a drop was used[1]. Determinations can be made both rapidly and quite accurately. However, this phase of the origin tests cannot distinguish human from primate blood and, when necessary, should be supplanted by instrumentation. An instrument known as a photronreflectometer readily separates closely related species that may not be distinguished by other techniques[2]. Foremost among these workers are *Boyden*, *De Falco*, and *Gemeroy* of Rutgers University. The grouping of dried blood stains is next conducted using serological methods.

Paints. The analysis of paint fragments calls for micro-chemical tests since one often works with very little material. In a typical hit-and-run case the forensic chemist examines traces of paint smears which sometimes remain on the clothing of a victim, or paint chips found at the scene of an accident, or on the cars of victim and subject. Automotive finishes used in cars manufactured in the United States are generally divided into two classes: the alkyd resins (synthetic enamels) and the nitrocellulose lacquers. Approximately half of the enamels used are the metallic enamels. These paints actually include finely divided aluminum flakes. The mesh sizes of these flakes are frequently an important factor in the identification of a particular manufacturer. Likewise, approximately half of the nitrocellulose lacquers are metallic. Automotive paint can be classified into four main categories, namely, metallic enamels, nonmetallic enamels, metallic lacquers, and nonmetallic lacquers. Each one of the four main categories is then separated according to color. So the first step in the examination of paint fragments is to determine the type of paint. This can be accomplished by semi-micro-qualitative tests. If the tests establish that the paint fragments compared are of a different type of paint this constitutes negative proof.

Hairs and Fibers. What part does microchemistry play in the examination of hairs and fibers? By examining hairs under filtered ultraviolet light one can determine whether dyes are present or not. If present they can be identified, using refined techniques of the micro-chemist. The commonest of the substances used as dyes include: the phenylene- and toluylenediamines, the methylated phenylenediamines, the amino- and diaminophenols, *p*-amino-diphenylamine, metol, hydroquinone and pyrogallol[3]. Criminals have long used hair bleaches and dyes for the purpose of avoiding apprehension or confusing eye witnesses to the commission of crimes. One can further determine whether hair is naturally blond or bleached, using infiltration tests devised by the FBI Laboratory[4]. The infiltration tests are predicated on the effect of the oxidizing process on the hair.

Microscopic and chemical methods conducted on a small scale are used for both identification and quantitative estimation of fibers.

Through the use of microchemistry certain fiber types can be dissolved and one can distinguish between hairs and natural silks, regenerated cellulose and cellulose derivatives. For example, with iodine and sulfuric acid cotton fibers swell and turn blue. The most characteristic microchemical reaction for cotton is the "ballooning" with ammoniacal copper solution or with trimethylbenzylammonium hydroxide[5]. With special dyes used with the reagents the cuticle, lumen wall, and protoplasmic remains in the fiber can be stained revealing their structure in relation to that of the cellulose cell wall which remains unstained.

Narcotics and Drugs. The primary step in examining substances suspected to contain narcotic material involves a determination as to whether the substance is alkaloidal or not. Again, one is often working with small amounts of matter. Extractions and tests must be carried out on a small scale. There is the problem of adulteration and the presence of fillers used to give bulk to a substance. Some of these narcotics include: opium, cannabis sativa, morphine, cocaine, codeine, and other morphine derivatives, as well as the newer synthetic drugs (demerol, dromoran, amidone, etc.). Often there are found minute quantities of a residue remaining in a hypodermic syringe and the problem is to identify the substance. Barbiturates and poisonous mixtures offer special difficulties of analysis.

If a substance is found to be non-alkaloidal and therefore, nonnarcotic the problem continues until the drug is identified. With cannabis sativa, commonly called marihuana microscopic, micro-chemical, and color tests are used to positively identify the substance. The *Duquenois* test is the most satisfactory test to date and has a sensitivity which can detect ½ milligram of the resin. The Bureau of Narcotics of the US Treasury Department has made some progress toward developing a quantitative method for the estimation of the resin but it is not ready for distribution[6]. Very recently technicians of the 27th Military Police Detachment Crime Laboratory have been able to identify the known active principle of cannabis (tetrahydrocannibinol) by using a Zeiss quartz spectrophotometer. With amounts of 100 mg and less a specific curve for tetrahydrocannibinol was found.

Techniques at the crime laboratory are carried out so that instrumental analysis (X-Ray Diffraction, Fluorescence Analysis, Spectrophotometry, Spectrography, etc.) are supplemented by microchemistry.

Glass Fragments. The value of information derived from an examination of glass fragments cannot be overestimated. Whereas spectrographic analysis will reveal the constituents present in a specimen of glass other techniques must be applied to ascertain the compounds present. The most sensitive method of analysis for determining minor differences

in the properties of glass is the physical method supplied by microchemistry. The method includes density and comparative refractive index determinations. Using flotation and gradient micromethods the individualization and comparison of glass found at the scene of a crime with the glass taken away by the perpetrator of a crime may lead to his identification as having been at the scene. If, for example, two pieces of glass prove to have the same physical properties of density and refractive index it is almost certain that they are identical in chemical composition and highly probable that they are from the same source[7]. This method has the advantage that there is almost no minimum quantity as long as the substance is visible.

Soil. Microchemistry exploits fully the potentialities of the use of soil as evidence in crimes of assault, rape, murder, hit-and-run, etc. Through microscopic, spectrographic, and density comparisons the identity or non-identity of soil samples can be ascertained. Even within very short distances soils differ in their chemical and physical properties. The most accurate method of establishing identity or non-identity of soil samples is the gradient tube method first applied by *P. L. Kirk* of the University of California. When two or more tubes compared reveal the same distribution of soil in their respective gradient tubes the soils compared are in all probability from the same source. The minimum amount of soil required for such a comparison is 5 mg.

Documents. The testing of paper to determine the nature of the fibers, the testing of dried inks on paper to classify the type of ink and sometimes the age of an iron ink, the analysis of substances which may be used as an invisible ink (secret writing), the treatment of charred documents, the identification of counterfeit coins and currency, the analysis of adhesives on envelopes, the testing of documents for erasures etc. all of these have important aspects in the application of microchemistry and lend valuable support to the document examiner and forensic chemist in a detection laboratory.

Summary

The application, then, of microchemistry in the field of forensic chemistry is unlimited. The identification of blood and body fluids, paint, hairs and fibers, narcotics and drugs, glass fragments, soil, the examination of dust, stains, explosives, metals, chemical accelerants used in arson cases, the examination of powder for firearms, the search for powder residues remaining on clothing or in the barrel of a firearm, the identification of poisonous mixtures, the analysis of tobacco, liquor, and innumerable other objects should convince any skeptic of the tremendous importance of microchemistry in the field of forensic chemistry.

Though instrumental analysis may be rapid, modern, and accurate the techniques of microchemistry and instrumental analysis should supplement rather than try to replace one another.

Zusammenfassung

Die Identifizierung von Bodenproben, Glasstücken, die Untersuchung von Staub, Flecken, Explosivstoffen, Metallen, chemischen Brandsätzen, Schießpulver, Pulverrückständen auf Kleidern oder in Gewehrläufen, die Identifizierung von Giften, die Analyse von Tabak, Getränken und zahlreichen anderen Objekten erweisen die Mikrochemie als wesentlich für die Aufgaben der forensischen Chemie. Wenn auch die instrumentelle Analyse rasch, modern und genau arbeitet, so sollen die Verfahren der Mikrochemie und der instrumentellen Analyse einander ergänzen, statt sich gegenseitig den Rang streitig zu machen.

Résumé

Dans le domaine de la chimie légale, le champ d'applications de la microchimie est illimité. Tout sceptique doit être convaincu de l'importance considérable de ces applications de la microchimie s'il considère qu'elle permet l'identification du sang et des liquides du corps, des peintures, des poils et des fibres, des narcotiques et des drogues, des fragments de verre, des sols, l'examen des poussières, des souillures, des explosifs, des métaux, des accélérateurs chimiques employés lors d'incendies criminels, l'examen des poudres d'armes à feu, la recherche des résidus de poudre subsistant sur des vêtements ou dans le barillet d'une arme à feu, l'identification de mélanges toxiques, l'analyse du tabac, des liqueurs ainsi que d'innombrables autres investigations. Bien que l'analyse instrumentale puisse être rapide, moderne et précise, elle doit compléter les techniques de la microchimie plutôt que de se substituer à elles.

References

[1] *S. Smith* and *I. Glaister*, Recent Advances in Forensic Medicine. London: Churchill. 1939. p. 120.

[2] *Boyden*, *De Falco*, and *Gemeroy*, 5th Int. Congress on Blood Transfusion, September 1954.

[3] *F. Bamford*, Poisons, Their Isolation and Identification. London: Churchill. 1951. p. 287.

[4] FBI Law Enforcement Bulletin, December 1940.

[5] Matthew's, Textile Fibers. 5th Ed., edited by *H. R. Mauersberger*. New York: Wiley. 1947. p. 223.

[6] Personal communication.

[7] *P. L. Kirk*, Density and Refractive Index. Their Application in Criminal Identification. Springfield: Charles C. Thomas. 1951. p. 55.

Aus dem Chemischen Laboratorium des Institutes für gerichtliche Medizin der Universität Wien

Anwendung mikrochemischer Methoden in der Kriminalistik

Von

Franz X. Mayer †

Mit 10 Abbildungen

(Eingelangt am 21. April 1955)

Die gerichtliche Chemie, wie wir sie heute verstehen, umfaßt praktisch sämtliche Vorgänge des täglichen Lebens, die ja irgendwie immer chemische Probleme beinhalten bzw. auslösen. Ursprünglich verstand man unter gerichtlicher Chemie vorwiegend die chemische Hilfe zur Klärung medizinischer Fragen die Rechtsprechung betreffend, somit vor allem Fragen toxikologischer Natur. Die Entwicklung, die diese Arbeitsrichtung aber in den letzten Jahrzehnten genommen hat, zeigte nun eindeutig, daß nicht nur die gerichtliche Medizin, sondern überhaupt die gesamte naturwissenschaftliche Kriminalistik aus der Hilfsstellung der Chemie ungeahnten Nutzen zogen und immer noch ziehen, indem diese vielfach das Rüstzeug liefert bzw. die Wege für weitere Forschungen ebnet. Erst die Anwendung mikrochemischer Methoden und die Heranziehung physikalisch-chemischer Untersuchungsverfahren, wie Röntgentechnik, Mikrophotographie und Spektroskopie, ermöglichten in der Kriminaltechnik die Analyse „kriminalistischer Spuren" und somit die Erfassung und Sicherung der für die Aufklärung eines Geschehens so wichtigen „objektiven Beweise" [6, 8, 11, 18].

Somit ist heute die Tätigkeit eines forensischen Chemikers im wahrsten, aber auch weitesten Sinne des Wortes die eines angewandten Chemikers mit besonderer Betonung der Analytik; vor allem aber der Mikroanalyse. Diese Tätigkeit erfordert neben einer gründlichen chemischen Ausbildung u. a. entsprechende physikalische, medizinische, botanische, mineralogische und technische Kenntnisse, Intuition und etwas Phantasie — von letzterer aber nicht zu viel —, vor allem aber sehr reiche Erfahrung gepaart mit einer strengen Selbstkritik.

Es liegt in der Natur der Sache, daß das zur Beurteilung vorliegende Material in der Regel sehr schwierig und kompliziert, meist auch unzureichend ist. Im allgemeinen hat sich der forensische Chemiker mit der Erfassung und Identifizierung kleinster Substanzmengen zu beschäftigen, die zumeist in einer verhältnismäßig sehr großen Ballastmenge verteilt sind. Es hat daher in der Regel vor dem Nachweis und der Bestimmung eine chemische Anreicherung zu erfolgen[15].

Obwohl es auf dem Gebiete der gerichtlichen Chemie praktisch nur sehr ähnliche, aber nie vollkommen gleiche Fälle gibt, läßt sich die unerläßliche chemische Anreicherung, wenn auch unter Berücksichtigung der Fragestellung, im großen und ganzen doch zu einem allgemeinen Analysengang zusammenfassen. Flüchtige Substanzen wird man durch Destillation der Spuren oder der Hauptbestandteile anreichern, nicht flüchtige organische Verbindungen bzw. anorganische Substanzen wird man durch Extraktion der Spuren oder der Hauptbestandteile bzw. mittels Dialyse, Chromatographie, Ionenaustausch oder durch Fällung abtrennen. Substanzen, die eine Mineralisierung vertragen, werden am einfachsten durch Zerstörung der organischen Ballaststoffe, sei es durch Veraschen, sei es durch nassen oxydativen Aufschluß mit nachfolgender Extraktion oder Fällung angereichert.

Ungleich schwieriger gestaltet sich in der Regel eine sichere und eindeutige Identifizierung der abgeschiedenen fraglichen „Spuren". Man muß sich darüber im klaren sein, daß der forensische Chemiker im allgemeinen trotz erfolgter Anreicherung mit Substanzmengen arbeiten muß, die sich zwischen Bruchteilen von Mikrogrammen und Bruchteilen von Milligrammen, seltener von Milligrammen bewegen. Er benötigt daher sehr selektive Nachweisreaktionen hoher Empfindlichkeit, wie solche vielfach in der Tüpfelanalyse, den kolorimetrischen Verfahren, aber auch in den Kristallfällungen zur Verfügung stehen.

Da eine der Haupttätigkeiten des kriminalistischen Chemikers darin besteht, Identitätsbeweise zu erbringen, wird er vorwiegend solche Untersuchungsverfahren bevorzugen, die es auch bei Vorliegen geringster Substanzmengen ermöglichen, einen erschöpfenden Befund zu erheben. Als ein solches besonders geeignetes Verfahren erwies sich bei kriminalistischen Untersuchungen vor allem die Spektroskopie, sowohl als Emissions- als auch als Absorptionsspektralanalyse[11, 18]. Mit der Emissionsspektralanalyse lassen sich vor allem die Elemente mit Metallcharakter bis zu 0,001% erfassen; absolut genommen ergibt dies Mengen von etwa einem Mikrogramm und noch Werte darunter. Absorptionsspektralanalytisch lassen sich noch Substanzen nachweisen und bestimmen, die in der Größenordnung von Milligrammen und darunter vorliegen.

Die vielseitigen Anforderungen, die derzeit an einen Gerichtschemiker gestellt werden, und ihre Bewältigung mit Hilfe mikrochemischer Metho-

den, lassen sich am besten durch eine Reihe von Beispielen aus unserer langjährigen Praxis aufzeigen.

Die Ermittlung einer Brandursache[1, 4] bei Verdacht einer Brandstiftung gehört oft zu den schwierigsten Aufgaben der naturwissenschaftlichen Kriminalistik und bedarf in der Regel der Mitarbeit eines erfahrenen Chemikers zwecks Erbringung des Nachweises, ob und welche Mittel zur Brandlegung verwendet wurden. Oft lassen sich durch einfache Wasserdampfdestillation unter Verwendung eines von uns entwickelten Spezialvorstoßes (vgl. Abb. 1) aus dem Brandschutt Reste von flüssigen, flüchtigen Brennstoffen abtreiben und dann als solche isolieren[10]. Da ein sehr wesentliches Kriterium zur Charakterisierung eines flüssigen Brennstoffes die Kenntnis seines Flammpunktes ist, haben wir Versuche unternommen, diesen auch an so kleinen Mengen reproduzierbar zu bestimmen. Dies führte zur Entwicklung eines kleinen Gefäßes (in Abb. 2 in natürlicher Größe wiedergegeben), in dem sich wenige Tropfen, z. B. eines Petroleums, nach Anheizen auf dem Mikroschmelzpunktsapparat prüfen lassen. Die Zündung erfolgt elektrisch über ein Induktorium. Mit diesem einfachen Apparat konnten wir mit zwei Tropfen eines Petroleums die gleichen Flammpunkte messen, die wir unter Verwendung erheblich größerer Mengen im amtlichen Petroleumprüfer nach *Abel-Pensky* erzielten.

Abb. 1

Abb. 2

Unter Verwendung einer Hochvakuumapparatur mit Hochfrequenzheizung lassen sich noch geringste Reste, d. h. Bruchteile von Milligrammen eines flüssigen Brennstoffes isolieren[1] und anschließend mittels Absorptionsspektralanalyse im UV und IR identifizieren[14].

Erheblichen Anteil haben chemische Untersuchungen an der Aufklärung von Fälschungen der verschiedensten Art, da sich in der Regel aus der Kenntnis der Zusammensetzung, sei es einer Legierung oder von Farben, Hinweise auf die Herkunft gewinnen lassen. In diesem Zusammenhang sei auf die eingehenden mikrochemischen Untersuchungen von *H. Malissa*[9] bzw. *R. Strebinger*[16] zur Beurteilung von Kunstgegenständen und Gemälden hingewiesen. Im gegenständlichen Fall handelte es sich um die Fälschung von Bezugscheinen; gefragt war, ob die auf dem weißen Arbeitsmantel des mutmaßlichen Täters aufscheinenden Farbflecke mit den Farben der Druckerzeugnisse übereinstimmen (vgl. Abb. 3). Es wurden rote und blaue Farbflecke tragende Teile des Arbeits-

mantels sowie die entsprechenden Farben des Druckerzeugnisses bzw. nicht mit Farbe versehenes Vergleichsmaterial vom Mantel und Papier im mechanischen Abreißbogen (100 V, 4 A) auf spektralreinen Kohleelektroden verbrannt und die Emissionsspektren im UV mittels eines Quarzspektrographen Q 24 (Spaltbreite: 0,005 mm) aufgenommen; abgebildet wurde auf die Spaltebene. Unter den gleichen Bedingungen wurden auch Abschnitzel von den mit Farbe beschmutzten Fingernägeln des fraglichen Täters geprüft. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Spektralanalytische Untersuchung der Farbflecke eines Arbeitsmantels bzw. der Farben eines gefälschten Druckerzeugnisses

Probe	Fläche in cm^2	Gew. in g	Asche in %	Ag	As	Ba	Co	Cr	Cu	Mn	Pb	Sn	Ti	Zn
Papier vom nicht bedruckten Rand .	53,0	0,5115	15,2	±	−	−	−	±	++	±	−	±	−	±
Papier mit blauem Farbaufdruck	53,0	0,5488	15,4	+	±	++	+	++ +	++	++	++	+	++ +	+
Papier mit rotem Farbaufdruck auf blauem Grund....	15,5	0,1689	15,7	+	−	++ +	+	++ +	++	++	++	++	++ +	+
Papier mit roter Schrift auf rotblauem Grund ...	6,7	0,0733	15,7	+	−	++ +	+	++ +	++	++	++	++	++ +	+
Arbeitsmantel von einer nicht beschmutzten Stelle.	3,0	0,0596	0,9	±	−	−	−	−	++	−	−	−	−	−
Arbeitsmantel mit blauem Farbfleck .	4,0	0,1214	25,0	+	±	++ +	±	++ +	++	+	++	++	++ +	+
Arbeitsmantel mit rotem Farbfleck ..	3,0	0,0777	5,7	+	−	++ +	++	++ +	++	++	++	++	++ +	−
Abschnitzel von den beschmutzten Fingernägeln.....	−	0,1253	1,7	+	−	++	±	++	++	+	+	−	+	+

Hierbei zeigte sich gute Übereinstimmung des anorganischen Pigments der korrespondierenden Farben. Aber auch in den Abschnitzeln der Fingernägel ließen sich die in den Druckerzeugnissen enthaltenen Elemente nachweisen. Des weiteren wurden die rote und die blaue Farbe des Druckerzeugnisses und des Arbeitsmantels mit geeigneten Lösungsmitteln eluiert — am besten eignete sich Essigester — und von den klaren, gelben, schwach rotstichigen Lösungen die Absorptionsspektren

im UV mittels eines Spektralphotometers nach *Beckman* aufgenommen. Unter Verwendung eines besonders konstruierten Halters für die dünnen Küvetten des *Scheibe*schen Küvettensatzes war es möglich, die nur sehr geringen Mengen (0,5 ml) der an sich schon sehr verdünnten Lösungen erfolgreich zu untersuchen. Wie aus Abb. 4 zu ersehen ist, zeigen die aus den blauen Farben des Mantels und des Druckerzeugnisses mit Essigester extrahierten Substanzen praktisch die gleiche Lichtabsorption, während der Extrakt der roten und blauen Farbe des Druckerzeugnisses eine Absorptionskurve ergibt, die als eine Summenkurve der Extrakte der roten und blauen Farbe des Arbeitsmantels anzusprechen ist. Das Ergebnis der emissions- und absorptionsspektralanalytischen Untersuchung spricht sehr dafür, daß die Farben auf den untersuchten Gegenständen identisch sind.

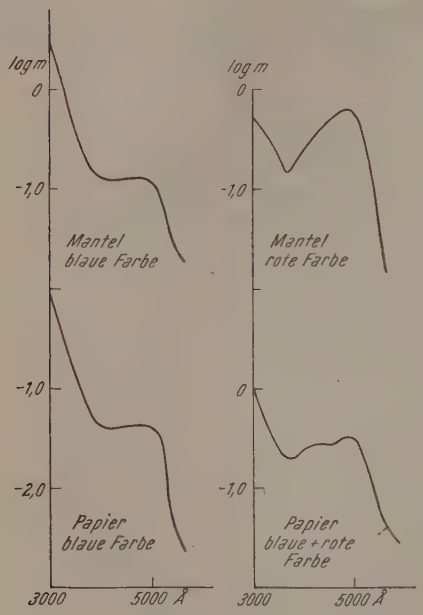


Abb. 4

Sehr erfolgverheißend sind entsprechende mikrochemische bzw. spektroskopische Untersuchungen der verschiedenen, bei Verkehrsunfällen immer entstehenden bzw. hinterlassenen „Spuren" besonders dann, wenn Fahrerflucht vorliegt[11]. In der Regel hinterläßt jedes mit einem Farbanstrich versehene, rammende Fahrzeug an den Stellen, an denen es das Opfer trifft, Spuren seines Anstriches. Bei Vorliegen entsprechender Vergleichsproben besteht die Möglichkeit, große Erfahrung vorausgesetzt, Hinweise zur Klärung des Geschehens zu gewinnen[19].

Im gegenständlichen Fall wurde an einem Winterabend zwischen dem Randstein einer Rettungsinsel und den Straßenbahnschienen liegend eine weibliche Leiche gefunden. Aus der Lage der Leiche, den Verletzungen und den Verschmutzungen an ihren Kleidern war der Schluß zu ziehen, daß der Unfall durch einen vorbeifahrenden Zug der Straßenbahn gesetzt worden war. Zur Untersuchung wurden übergeben: ein grüngefärbter Kniestrumpf vom linken Bein der Leiche; dieser zeigte im Bereiche der Kniekehle eine großflächige (4 × 5 cm messende) schmut-

zige Verfärbung mit deutlichem Geruch nach Schmieröl; ferner eine Probe Schmierfett aus der Stümmelkappe eines Straßenbahnwagens. Proben und Vergleichsproben wurden einerseits emissionsspektroskopisch, andererseits nach Extraktion mit Äther mikrochemisch bzw. absorptionsspektroskopisch untersucht. Das Ergebnis der emissionsspektralanalytischen Untersuchung ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. Zusammenstellung

der Ergebnisse der spektralanalytischen Untersuchung der Schmierölflecke auf einem Strumpf und einer Schmierölprobe aus der Stümmelkappe eines Straßenbahnwagens betreffend einen Verkehrsunfall (Ch 430/54)

Probe	Ag	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Pb	Si	Sn	Zn
Schmieröl aus der Stümmelkappe eines Straßenbahnwagens	±	++	−	++ +	+	+	++ +	++ +	++	++	++ +	++	±
Strumpf mit Ölfleck	±	++	±	++ +	++	+	++ +	++ +	++	++	++ +	++	±
Strumpfgewebe zum Vergleich	−	++	+	++ +	++	+	++ +	++ +	±	±	++ +	±	±

Die vom Äther befreiten Extraktionsrückstände stellten bei sämtlichen Proben reichliche Mengen einer braunschwarzen, schmierigen Substanz von mehr fester als öliger Konsistenz dar. Die Prüfung der getrockneten, ätherfreien Extrakte mit der Mikromethode nach *G. Gorbach*[3] ergab die Abwesenheit von verseifbaren Anteilen. Die Extrakte bestanden zur Gänze aus unverseifbaren Mineralölbestandteilen. Der Brechungsindex wurde bei beiden Proben zu $n_D^{20} = 1{,}357$ gefunden.

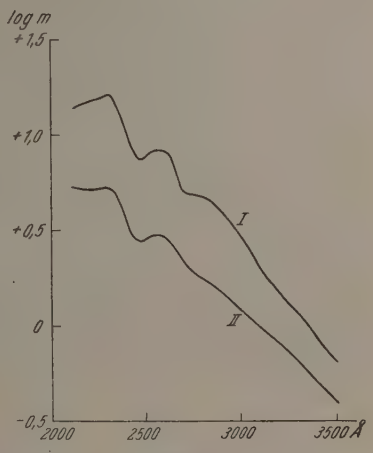


Abb. 5

Schließlich wurden Teile der Extrakte in entaromatisiertem Normalbenzin gelöst und von diesen Lösungen die Lichtabsorption im UV bestimmt. Wie aus den in Abb. 5 wiedergegebenen Extinktionskurven zu ersehen ist, zeigen die Lösungen der in gereinigtem Normalbenzin gelösten Ätherextrakte eine charakteristische Absorption mit je einem Maximum bei 2540 Å bzw. 2300 Å. Die Übereinstimmung beider Proben

war gut, so daß der berechtigte Schluß gezogen werden konnte, daß der Unfall durch einen Zug einer Straßenbahn hervorgerufen worden war, und zwar war die Frauensperson von der Stümmelkappe eines rechtsseitigen Rades getroffen worden.

Einen sehr erheblichen Beitrag leisten chemische Untersuchungen zur Beurteilung von Schußverletzungen[11, 17, 18]. Der Vorgang eines Schusses beinhaltet neben der mechanischen Wirkung eine Reihe von chemischen Umsetzungen, deren Spuren sich allenthalben in der Geschoßbahn und vor allem an solchen Stellen nachweisen lassen, die eine Änderung in der Dichte der von den Treibgasen bzw. dem Geschoß durcheilten Medien aufweisen. Durch mikroskopische, mikrochemische und spektralanalytische Untersuchungen des Schußkanales und seiner Umgebung auf unverbrannte Pulverteilchen, auf Verbrennungsrückstände des Pulvers sowie auf die vom Geschoß bzw. aus der Treibladung und dem Zündsatz stammenden Metalle, vor allem Blei, allenfalls Quecksilber, Antimon, Zinn, mitunter Barium, lassen sich wertvolle Hinweise auf die Richtung und Entfernung der abgefeuerten Waffe vom Opfer sowie auf die verwendete Munition gewinnen.

Wir haben den von *J. T. Walker*[17] angegebenen Test zur Feststellung eines Nahschusses eingehend überprüft und seine Einfachheit in der Anwendung sowie die Bedingungen zu seiner Reproduzierbarkeit festgestellt[12]. Im wesentlichen wird ausfixiertes gewöhnliches, glänzendes Photopapier durch 10 Minuten mit einer 0,5%igen Sulfanilsäurelösung und nach dem Trocknen mit einer 0,5%igen α-Naphthylaminlösung getränkt und mit Methanol gehärtet. Die schußverdächtigen Kleidungsstücke bzw. Hautstellen werden auf das so präparierte Papier gelegt, mit einem mit 10%iger Essigsäure befeuchteten Tuch bedeckt und durch 10 Minuten heiß geplättet, wobei die Temperatur des Plätteisens 150°C nicht übersteigen darf. Unter diesen Bedingungen reagieren die Nitrite der Verbrennungsprodukte des Pulvers wie Abb. 6 zeigt mit dem organischen Agens des präparierten Photopapieres unter Bildung intensiv rot gefärbter Farbflecke (Diazotierung und Kupplung).

Daß die Kriminaltechnik auch aus dem sinnvollen Anwenden der in der Papierchromatographie gewonnenen Erkenntnisse entsprechenden Nutzen ziehen kann, haben *S. Odén* und *B. v. Hofsten*[13] durch ihre Arbeiten über den Nachweis von Fingerabdrücken in sehr eindrucksvoller Weise dargelegt, indem sie zeigten, daß diese sich über die in den Schweißabsonderungen enthaltenen geringen Spuren an Aminosäuren mittels der Ninhydrinreaktion nachweisen lassen und daß dieser Nachweis zum Unterschied gegenüber den bisher üblichen Methoden mit Joddämpfen noch nach Jahren gelingt. Wir haben diese Reaktion überprüft und auch auf Papieren, die nachweislich mehrere Jahre alt und in der Zwischenzeit nicht benützt worden waren, gute, reproduzierbare Ergebnisse erzielt

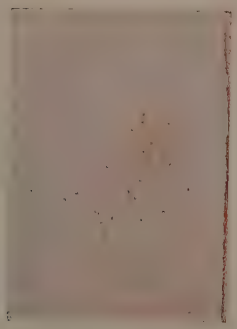


Abb. 6

Abb. 3

Springer-Verlag in Wien

Druck: F. Jasper, Wien

(Abb. 7). Voraussetzung ist absolut wasserfreies Aceton als Lösungsmittel für Ninhydrin, worin die Papiere zu baden sind, und anschließendes Erwärmen im Trockenschrank durch mehrere Minuten auf 80° C.

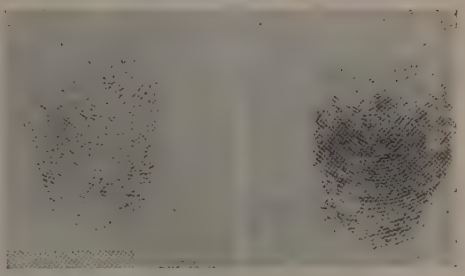


Abb. 7

Aus dem großen Gebiet der toxikologischen Untersuchungen sei abschließend einiges über den Nachweis und die Identifizierung von Schlafmitteln vom Typus der Barbitursäurederivate berichtet. Die bei uns verbreitetsten Präparate sind Veronal (Diäthylbarbitursäure), Luminal (Phenyläthylbarbitursäure) und Phanodorm. Ihr Mißbrauch ist eine der derzeit häufigsten Vergiftungsarten.

Die Ausmittlung erfolgt in der Regel durch Extraktion mit weinsaurem Alkohol und Ausschütteln der Filtrate der wäßrigen Lösungen

Abb. 8

der Extraktionsrückstände mit saurem Äther bzw. Chloroform. Zur Reinigung werden die wäßrigen Lösungen der Rückstände der sauren Äther- bzw. Chloroformextrakte bei bicarbonatalkalischer Reaktion mit Äther erschöpfend ausgeschüttelt. Die Lösung dieser Verdunstungsrückstände in Chloroform wird mit Tierkohle durchgeschüttelt und filtriert. Der nun anfallende Verdunstungsrückstand ist in der Regel

farblos und zeigt nach längerem Stehen Kristallisation. Trotzdem sind diese Rückstände im allgemeinen noch nicht schmelzpunktrein[5]. Durch von den Schlafmitteln stammende Abbauprodukte ergibt sich fast stets

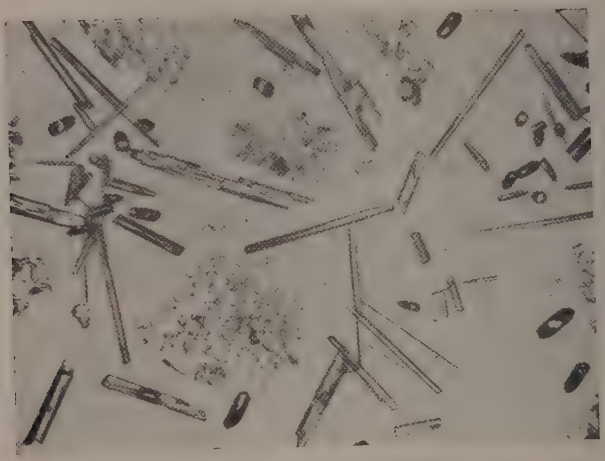


Abb. 9

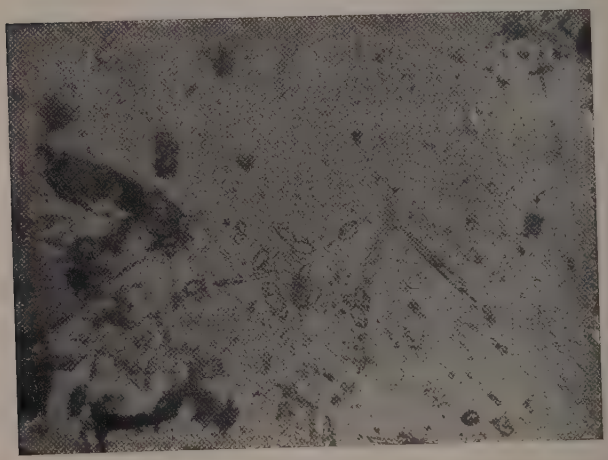


Abb. 10

eine mehr oder minder erhebliche Depression des Schmelzpunktes. Der Nachweis, daß ein Barbital vorhanden ist, bietet im allgemeinen keine besonderen Schwierigkeiten, auch die quantitative Erfassung kleinster Mengen ist Dank der spektralphotometrischen Mikroverfahren,

die uns zur Verfügung stehen, verhältnismäßig rasch durchführbar[2], Schwierigkeiten bzw. Langwierigkeiten ergeben sich aber fast stets, wenn es erforderlich ist, den Nachweis eines bestimmten Schlafmittels zu führen, somit einen Identitätsbeweis zu erbringen. Dieser gelingt eigentlich nur durch Bestimmung des Mikroschmelzpunktes nach *Kofler*[7] an durch langwierige Sublimation gereinigten Kristallen. Für eine rasche und dennoch sichere Identifizierung lassen sich nun mit Vorteil die beim Erhitzen auf dem Mikroschmelzpunktstisch feststellbaren Kristallumwandlungen heranziehen. Aus einem Kristallisationsrückstand, der Luminal enthält, läßt sich dieses an dem Auftreten kleiner, schiefwinkeliger rhomboedrischer Prismen (Abb. 8), erkennen, während Veronal lange Kristallspieße ergibt (Abb. 9); Phanodorm wieder gibt sich durch gruppenweise angeordnete sechseckige Kristalltafeln zu erkennen (Abb. 10).

Zusammenfassung

An Beispielen aus der Praxis wird die Anwendung mikrochemischer Methoden zur Klärung kriminalistischer Probleme dargelegt. Gebracht werden Untersuchungen zur Aufklärung von Bränden, Fälschungen, Verkehrsunfällen, Schußverletzungen, neuere Methoden zur Feststellung von Fingerabdrücken bzw. die Identifizierung von Schlafmitteln vom Typus der Barbitursäurederivate.

Summary

The application of microchemical methods in the solution of police problems is shown by means of actual examples. Pertinent instances include arson, forgery, traffic accidents, bullet wounds, new methods for taking finger prints, identification of soporifics of the barbiturate type.

Résumé

Des exemples tirés de la pratique montrent les possibilités d'emploi des méthodes microchimiques pour la résolution de problèmes criminels. Ils comportent les recherches effectuées à la suite d'incendies, de faux, d'accidents de la circulation, de blessures par armes à feu ainsi que les méthodes nouvelles de relèvements des empreintes digitales, ou d'identification de somnifères du type des dérivés de l'acide barbiturique.

Diskussion

H. *F. Dangl* (Wien): Ich bemerke, daß speziell bei Brandstiftungen in vielen Fällen mit einem kleinen, transportablen Fluoreszenzgerät sehr wertvolle Anhaltspunkte für die Probenahme am Tatort gefunden werden können. Ich hatte Gelegenheit, einen Fall zu untersuchen, wo infolge Abschmelzens von Zinkblechverkleidungen und Verdampfen des Zinks die Temperaturfelder eng abgegrenzt werden konnten, wo dann leider erst nach späterer Verständigung ein Abgehen mit Fluoreszenzgerät am Tatort stattgefunden hat. Die effektiven Auffindungsstellen konnten wesentlich eingegrenzt und sichtbar gemacht werden, so daß das Entnehmen von Blindproben entfallen konnte. Ich möchte darauf hinweisen, daß sich hierdurch nicht nur bei Brandstiftungen, sondern auch bei Sprengunglücken weitgehende Vorteile bieten können.

H. *F. X. Mayer:* Dies beweist, daß der Gerichtschemiker nicht einseitig sein darf; er ist angewandter Chemiker und er muß mehr oder minder alles zur Aufklärung der ihm gestellten Fragen benützen, was ihm die Wissenschaft zur Verfügung stellt.

Literatur

[1] Beiträge zur Lehre von der Brandermittlung. Herausgeg. im Einvernehmen m. d. Pol. Inst. Hiltrup. i. A. d. Schleswig-Holsteinschen Landesbrandkasse. Kiel: 1952.

[2] *St. Goldschmidt, W. Lamprecht* und *E. Helmreich*, Z. physiol. Chem. **292**, 125 (1953).

[3] *G. Gorbach*, Mikrochem. **31**, 302 (1943).

[4] *R. Graßberger*, VFDB-Zeitschrift **1**, Nr. 2 (1952).

[5] *H. Jansch* und *F. X. Mayer*, Beitr. gerichtl. Med. **19**, 64 (1952).

[6] *P. L. Kirk*, Crime Investigation. New York: Interscience. 1953.

[7] *L.* und *A. Kofler*, Thermo-Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie. 1954.

[8] *A. Lucas*, Forensic Chemistry and Scientific Criminal Investigation. London: E. Arnold. 1945.

[9] *H. Malissa*, Mikrochem. **35**, 34, 302 (1950).

[10] *F. X. Mayer*, Beitr. gerichtl. Med. **18**, 169 (1949).

[11] *F. X. Mayer*, Spektrochim. Acta **5**, 63 (1952).

[12] *F. X. Mayer* und *N. Wölkart*, im Druck.

[13] *S. Odén* und *B. v. Hofsten*, Nature **173**, 449 (1954).

[14] *A. Schöntag* und *W. Specht*, Kriminalistik 5/54.

[15] *H. Specker* und *H. Hartkamp*, Angew. Chem. **67**, 173 (1955).

[16] *R. Strebinger*, Mikrochem. **36/37**, 805 (1951).

[17] *J. T. Walker*, J. Crim. Law Criminology **31**, 497 (1940).

[18] *O. Werner*, Angew. Chem. **65**, 69 (1953).

[19] *N. Wölkart*, in *W. Laves*, Der Straßenunfall. Stuttgart: F. Enke. 1955.

Aus der Med. Universitätsklinik, Abt. für innere Krankheiten, Zagreb, Jugoslavien

Der Sublimattest als Mikromethode zur Bestimmung der γ-Globuline im Serum

Von

Mira Keler-Bačoka

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 21. Juni 1955)

Neben den üblichen klinisch-chemischen Mikrountersuchungen gelang es in den letzten Jahren, besonders nützliche und einfache Mikromethoden auf dem Gebiete der Eiweißchemie zu entwickeln. Von der klassischen Mikro-Kjeldahl-Stickstoffbestimmung abgesehen, wurde eine ganze Reihe von Mikroverfahren ausgearbeitet, die die Möglichkeit geben, Eiweiß sowie dessen Abbauprodukte qualitativ und quantitativ zu bestimmen (Elektrophorese[1], Biuretreaktion[2], Papierchromatographie[3], Serumlabilitätsteste usw.[1]). Alle diese Verfahren werden mit Mengen von 0,05 bis 0,10 ml ausgeführt und sind in medizinisch-chemischen Laboratorien gut eingeführt.

Wie bekannt gibt die Papier-Elektrophorese für die qualitative und quantitative Trennung der einzelnen Eiweißfraktionen die zuverlässigsten Ergebnisse. Dennoch ist diese Art der Analyse zeitraubend und kann auch ohne einen Elektrophoreseapparat und ohne Photometer nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grunde werden in sehr vielen Laboratorien Serumlabilitäts- oder Flockungsreaktionen durchgeführt, die ebenfalls einen Einblick in die Verschiebungen der Serumeiweißfraktionen gestatten. Diese Mikromethoden sind äußerst einfach und rasch durchführbar und zeigen durch verschiedene Trübungsgrade ein qualitativ und quantitativ gestörtes Gleichgewicht des Albumin-Globulin-Quotienten im Serum oder Plasma an.

Einige dieser Flockungsreaktionen weisen auf nur eine oder zwei erhöhte Globulinfraktionen hin. Zum Beispiel deutet ein verkürztes Weltmannband[4] vermehrte α- und β-Globuline an, erhöhte β- und γ-

Fraktionen werden durch *Maclagan*'s Thymol-[5] und Goldsolreaktion[6], aber auch nach *Wunderly* mit Cadmiumsulfat[7] etc. gefunden. Vermehrte γ-Globulinmengen werden durch pathologische Resultate des verlängerten Weltmannbandes, die Kunkel-Zinksulfattrübung[8], den Sublimattest[9] usw. angezeigt.

Methodik

Der Sublimattest nach *Keler* und *Dević* ist, wie erwähnt, ein spezifischer Test für erhöhte γ-Globulinwerte. Das Prinzip beruht auf der Möglichkeit, die vermehrte γ-Globulinfraktion in einer Lösung, die durch Soerensen-Phosphatpuffermischung auf den isoelektrischen Punkt der γ-Globuline, p_H 7,2, fixiert ist, mit Sublimatlösung zu fällen. Die Menge der entstandenen Trübung wird elektrophotometrisch ausgewertet und auf Sublimateinheiten berechnet. Normalwerte liegen zwischen 1 und 5 Einheiten.

Technik des Sublimattestes

Lösungen:

1. Kaliumdihydrogenphosphatlösung, $^1/_{15}$-m: 9,078 g KH_2PO_4 in dest. Wasser auf 1000 ml lösen;
2. Natriumhydrogenphosphatlösung, $^1/_{15}$-m: 11,876 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ in dest. Wasser auf 1000 ml lösen;
3. Mischung von 28 ml der Lösung 1 und 72 ml der Lösung 2;
4. Sublimatlösung: 0,047% $HgCl_2$ in dest. Wasser.

Ausführung:

Zu 5 ml der Lösung 3 gibt man mittels Mikropipette 0,10 ml Serum. Dazu fügt man 0,40 ml der Lösung 4 und vermengt gut. Zu gleicher Zeit wird ein Blindversuch ausgeführt, um die Färbung des Serums zu kompensieren: 5,40 ml der Lösung 3 und 0,10 ml Serum werden gemischt. Die Auswertung erfolgt nach 20 Minuten im Pulfrich-Photometer bei der Wellenlänge 430 mμ und 10 mm Schichtdicke.

Berechnung:

$$\frac{E}{0{,}07} = \text{Sublimat-Einheiten}$$

Die photometrische Eichkurve wurde mit Bariumsulfatlösungen zur Thymolbestimmung nach *Shank* und *Hoagland* ermittelt.

Die Elektrophoreseparallelversuche zu den Sublimatuntersuchungen wurden mit dem Begre-Kataphor-Apparat in einer Phosphatpufferlösung pH 9,2, bei einer Spannung von 3 bis 4 V/cm ausgeführt. Normalwerte: Albumine 55,5 bis 63,3 rel%, α_1-Globuline 4,2 bis 5,8 rel%, α_2-Globuline 7,1 bis 8,1 rel%, β-Globuline 7,9 bis 9,3 rel%, γ-Globuline 16,5 bis 21,3 rel%.

Die Spezifität des Sublimattestes wurde in früheren Arbeiten[9, 10] auf

die Weise geprüft, daß 300 Parallelversuche mit Elektrophoreseergebnissen verglichen wurden. Es wurde ein Korrelationsprozentsatz von 91% bzw. 96,5% gefunden, d. h. Sera mit elektrophoretisch bestimmten vermehrten γ-Globulinfraktionen ergaben in 91 bzw. 96,5 Fällen v. H. positive Sublimattestresultate.

Es wurde weiters der Einfluß zugegebener isolierter Albumine und γ-Globuline geprüft. Die Zugabe von Albuminen als Koagulationsinhibitoren verminderte das Ergebnis der Sublimatreaktion. Hingegen erhöhte die Zugabe von γ-Globulinen diese Resultate. Hiermit wurde die hemmende Wirkung des Albumins und die fördernde des γ-Globulins auf den Ausfall des Sublimattestes bewiesen.

Diskussion und Resultate

Anschließend an diese Resultate wurde nochmals versucht, die Spezifität des Sublimattestes auf erhöhte γ-Globulinfraktionen zu prüfen. Die Untersuchungen wurden hierbei mit dem Niederschlage, der durch Sublimat als Trübung oder Flockung gefällt wird, durchgeführt. Dieser Niederschlag wurde nach der oben angegebenen Technik gewonnen, indem die zehnfache Menge Serum sowie der einzelnen Lösungen verwendet wurde. Dadurch war es möglich, ein größeres Quantum des Niederschlages zu erhalten. Nach Ablauf der Fällungszeit wurde die Mischung 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen/mn zentrifugiert.

Die klare Flüssigkeit über dem Niederschlage wurde abgetrennt und aufbewahrt. Der Niederschlag wurde dreimal mit 10 ml der Sörensenmischung (pH 7,2) gewaschen, wobei dann die Flüssigkeit über dem Niederschlage verworfen wurde. Der so gereinigte Niederschlag löste sich in 0,9%iger Natriumchloridlösung. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Lösung des Niederschlages wurde im elektrischen Felde durch Papierelektrophorese untersucht. Parallel zu diesem Versuche wurde das Serum selbst sowie außerdem die erste abgetrennte Flüssigkeit über dem Niederschlage papierelektrophoretisch untersucht. Die erhaltenen Elektropherogramme, sowie die entsprechenden Kurven sind in Abb. 1, 2 und 3 wiedergegeben.

Abb. 1 zeigt das Elektropherogramm des Nativserums mit erhöhten α_2- β- und γ-Globulinfraktionen, dessen Sublimattest mit 13 Einheiten positiv war. Die relativen Prozente der einzelnen Fraktionen dieses Serums waren: Albumine 43,3, α_1-Globuline 6,7, α_2-Globuline 15,8, β-Globuline 10,0, γ-Globuline 24,2.

In Abb. 2 ist das Elektropherogramm des gelösten, gewaschenen Niederschlages wiedergegeben. Es zeigt nur eine einzige Zacke und zwar im γ-Globulinwanderungsgebiet. Die Trennung von den anderen Fraktionen ist vollständig. Abb. 2 stellt das Elektropherogramm der Flüssig-

keit über dem Niederschlage dar. Das Fehlen der γ-Globulinfraktion ist hier deutlich erkennbar. Dies war auch zu erwarten; denn das γ-Globulin wurde durch Sublimatfällung abgetrennt. In diesem Elektrophoreseversuch war es

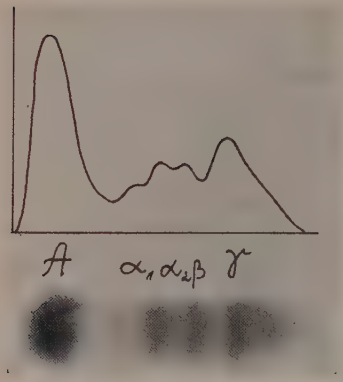


Abb. 1. Nativserum

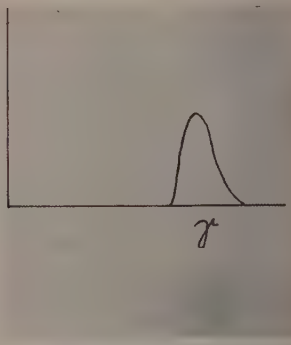


Abb. 2. Niederschlag des Sublimattestes

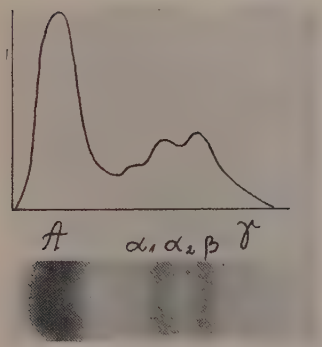


Abb. 3. Lösung des Sublimattestes nach Entfernung des Niederschlages

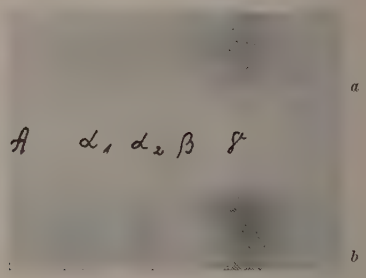


Abb. 4. Sublimattestniederschlag *a* gewaschen, *b* ungewaschen

notwendig, die fünffache Menge der Lösung aufzutragen, da das Serum durch den Sublimattest verdünnt wurde.

Aus diesen drei Versuchen kann man die Schlußfolgerung ziehen, daß die durch den Sublimattest erhaltene Trübung ausschließlich aus einem Niederschlag der gefällten γ-Globulinfraktionen besteht.

Auf Abb. 4 sind 2 Elektropherogramme von Lösungen des gewaschenen (a) sowie des ungewaschenen Niederschlages (b) abgebildet. Die Lösung des ungewaschenen Niederschlages zeigt Spuren anderer Fraktionen des

Serums; es ist daher notwendig, um den Niederschlag isoliert zu erhalten, diese Spuren durch Waschung zu entfernen.

Die Versuche zur Isolierung des Sublimattestniederschlages wurden weiters mit verschiedenen pathologischen Seren durchgeführt und zwar mit:

Seren mit vermehrten $\alpha_2 + \beta$-Globulinen: Abb. 5 No. 2 und 4;

Seren mit vermehrten β-Globulinen: Abb. 5 No. 3;

Seren mit vermehrten $\alpha_2 + \beta + \gamma$ Globulinen: Abb. 5 No. 5

Seren mit vermehrten γ-Globulinen: Abb. 5 No. 6.

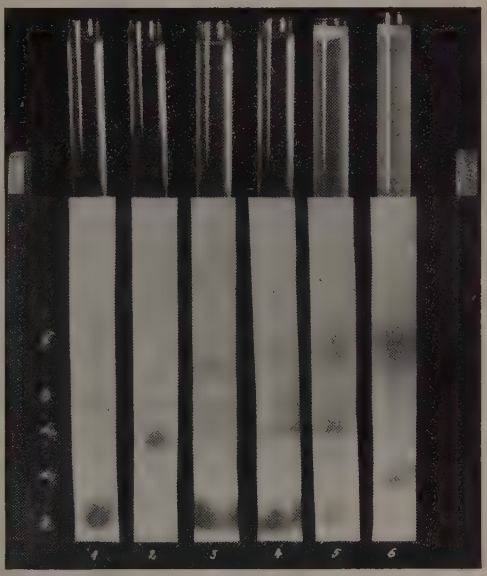


Abb. 5

Einige Beispiele davon sind an der Abb. 5 wiedergegeben. Die Trübung des Sublimattestes ist normal in den Fällen 1 bis 4 und pathologisch nur in den Fällen 5 u. 6. Wenn auch andere Globulinfraktionen der Sera 2 bis 4 nach der Tabelle 1 sehr erhöhte Werte zeigen, bleibt dennoch der Sublimattest normal, da

Tabelle 1

	Vermehrte Globulin-Fraktion	Albumin rel. %	α_1	α_2	β	γ	Sublimat-Test
			Globuline rel. %				
1. K. I. Normal		56,8	5,4	6,9	10,0	20,9	4
2. P. M. Nephrosis	$\alpha_2+\beta$	14,5	6,6	44,8	15,1	19,0	3
3. D. E. Hepatitis	β	54,8	6,4	7,8	12,6	18,4	5
4. D. M. Nephrosis	$\alpha_2+\beta$	48,5	8,2	14,8	12,0	16,5	5
5. B. R. Nephrosis	$\alpha_2+\beta+\gamma$	37,7	7,0	16,9	10,9	27,5	18
6. K. L. Cirrhosis	γ	15,4	3,4	3,0	7.2	71,0	28

es sich um keine pathologischen γ-Globulinvermehrungen handelt. Hingegen zeigen die Fälle 5 und 6, daß der Sublimattest mit positiven Resultaten nur auf γ-Globulin allein reagiert. Die elektrophoretischen Versuche

mit isolierten Sublimattestniederschlägen zeigten in allen Fällen das gleiche Bild wie Abb. 2, d. h. eine Zacke nur in dem γ-Globulingebiet. Daraus ergibt sich, daß beim Sublimattest keine anderen Globulinfraktionen mitgerissen werden, auch wenn diese in vermehrter Menge zugegen sind.

Ferner wurde versucht, den Sublimattestniederschlag zu trocknen und γ-Globulin daraus zu isolieren. Daraus ergab sich die Möglichkeit zur Gewinnung und Isolierung größerer Mengen γ-Globulin aus dem Serum mittels des Sublimattestes. Unsere Versuche werden in der Richtung weitergeführt, das auf diese Weise gewonnene γ-Globulin auf seine Reinheit zu prüfen.

Zusammenfassung

Der Niederschlag des Sublimattestes für γ-Globulin wurde papierelektrophoretisch untersucht und dabei festgestellt:

1. Der positive Test ist spezifisch ausschließlich für erhöhte γ-Globulinfraktionen.

2. Andere Globulinfraktionen, auch in stark vermehrten Konzentrationen werden durch den Sublimattest nicht mitgerissen.

3. Der Sublimattest zeigt die Möglichkeit zur Gewinnung und Isolierung größerer Mengen γ-Globulin aus dem Serum.

Summary

A paper-electrophoretic study was made of the precipitate of the sublimate test for γ globulin. It was found: 1) the positive test is specific only for increased globulin fractions; 2) other globulin fractions, even in strongly increased concentrations, are not carried down by the sublimate test; 3) the sublimate test shows the possibility of obtaining and isolating larger amounts of γ-globulin from the serum.

Résumé

L'électrophorèse sur papier du dépôt provenant de l'essai de chlorure mercurique de la γ globuline a permis d'établir les points suivants:

1) L'essai positif est exclusivement spécifique pour les fractions élevées de γ globuline.

2) Les autres fractions de globuline ne sont pas entraînées, lors de l'essai de chlorure mercurique même si leurs concentrations sont considérablement accrues.

3) L'essai de chlorure mercurique montre la possibilité d'isoler du sérum de plus grandes quantités de γ globuline.

Diskussion

Fr. *A. Rotter* (Wien): Wie mir bekannt ist, sind sowohl in Deutschland wie in der Türkei Untersuchungen über verminderte γ-Globulin-Gehalte im Blut in Gang. Haben Sie auch Resultate von solchen Fällen einer Hypo-γ-Globulinämie?

Fr. *M. Keler-Bačoka:* Das waren Fälle mit stark erhöhten α_2-Werten, wie

sie auch in der Literatur beschrieben sind. Wir finden dann meistens beim Sublimattest Werte von 0 oder + 1, also die geringste überhaupt mögliche Fällung.

Fr. *A. Rotter:* Die in Gang befindlichen Untersuchungen über Hypo-γ-Globulinämie bei verschiedenen Stoffwechselkrankheiten, so auch bei Diabetes, dürften von allgemeinem Interesse sein.

Literatur

[1] *F. Wuhrmann* und *Ch. Wunderly:* Bluteiweißkörper des Menschen. Basel: Schwabe. 1952.
[2] *A. Hiller,* Proc. Soc. Exp. Biol. **24,** 385 (1927).
[3] *F. Cramer,* Papierchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie. 1954.
[4] *R. Weltmann:* Med. Klinik **2,** 240 (1930).
[5] *N. Maclagan,* Nature **154,** 670 (1944).
[6] — Brit. J. Exper. Path. **25,** 15 (1944).
[7] *Ch. Wunderly* und *F. Wuhrmann:* Schweiz. med. Wschr. **75,** 1128 (1945).
[8] *H. G. Kunkel,* Proc. Soc. Exper. Biol. **66,** 217 (1947).
[9] *M. Keler-Bačoka* und *D. Dević-Mikac,* Acta Med. Scand. **149,** 237 (1954).
[10] *M. Keler-Bačoka,* Z. klin. Med. **153,** 230 (1955).

Istituto di chimica farmaceutica dell'Università di Ferrara

Sul riconoscimento microchimica della β-fenil isopropilamina

Gilda Cavicchi Sandri

Con 7 Figure

(Trasmesso 31 Maggio 1955)

La β-fenil isopropilamina è stata introdotta in terapia già da molti anni ed il suo uso è andato generalizzandosi, data la sua notevole attività farmacologica e la sua bassa tossicità[1].

Essa possiede azione simpatomimetica ed una tipica azione neuro e psico-stimolante ben nota, che si traduce in una rapida diminuzione del senso della fatica fisica e psichica[2] e nella comparsa di un senso di euforia e di una maggiore capacità di lavoro.

La necessità di utilizzare però dosi relativamente elevate, non sprovviste di azioni secondarie, di cui la principale è indubbiamente l'insonnia, e la controindicazione nei casi di ipertensione, coronarite, ecc. ha condotto alla preparazione di derivati attivi a dosi notevolmente più basse e sprovvisti di dette azioni secondarie. Il principale di essi è la fenil 2-metil isopropilamina, nota in commercio coi nomi specializzati di pervitina e di psichergina. Sulla sintesi di tali composti mantengono importanza fondamentale le ricerche di *Mingoia*[3].

Le reazioni di riconoscimento di queste basi sono fondate principalmente per la simpamina sulla sua capacità di formare composti colorati con idrossilammina[4] che possono essere utilizzati anche per il dosamento colorimetrico.

Anche il cloruro di p-nitrobenzodiazonio dà per copulazione un prodotto colorato impiegato per il dosamento nelle urine[5].

Dessi[6] ha proposto un metodo di dosamento fotometrico del picrato in soluzione di cloroformio e toluolo, mentre *Vogel*[7] ha messo a punto un metodo di riconoscimento della pervitina per trattamento con acido silicotungstico, con acido picrico, picrolonico e cloroplatinico.

Una differenziazione tra simpamina e pervitina è stata proposta da

Heubner[8] preparandone i singoli picrati e cloroplatinati e determinandone i punti di fusione.

La scarsità di reazioni di precipitazione che permettano di separare queste sostanze dalle soluzioni in cui possono essere contenute, mi ha indotto ad esperimentare il loro comportamento rispetto ad alcuni reattivi degli alcaloidi, atti a formare con molte sostanze a carattere basico composti di coordinazione insolubili, spesso dotati di abito cristallino caratteristico, tale da permetterne il riconoscimento microchimico all'esame microscopico.

In una nota precedente[9] ho proposto l'impiego dello jodobismutito potassico per il riconoscimento e la differenziazione di derivati dell'acido nicotinico, ed inoltre ho proposto un nuovo reattivo, mai impiegato prima d'allora, cioè l'acido bromobismutico, capace esso pure di dare con basi organiche composti dotati di notevole insolubilità e di abito cristallino ben differenziato.

Il comportamento della β-fenil isopropilamina in soluzione debolmente solforica, rispetto alla soluzione di jodobismutito potassico si è mostrato particolarmente interessante.

La concentrazione della base rispetto alla quantità di reattivo impiega-

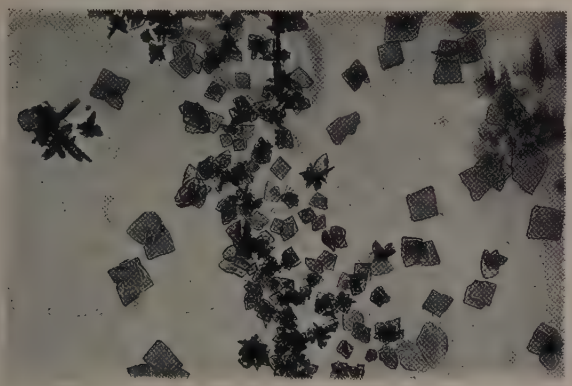


Fig. 1

to e la temperatura esercitano una azione determinante sulla formazione dei composti di coordinazione. I primi tentativi eseguiti senza tener conto di questi fattori hanno dato origine alla precipitazione di due composti cristallini molto diversi per forma e colore che precipitavano contemporaneamente (figura 1). Una serie di prove accurate mi ha permesso di precisare le condizioni sperimentali necessarie perchè i due composti potessero precipitare separatamente; ognuno di essi è dotato di un abito cristallino caratteristico che si presta ad un riconoscimento

microscopico della simpamina stessa. Infatti in presenza di soluzioni a notevole concentrazione di base e in presenza di piccole quantità di reattivo è possibile ottenere a freddo la separazione di un composto cristallino in laminette lucenti di color giallo aranciato (figura 2).

Fig. 2

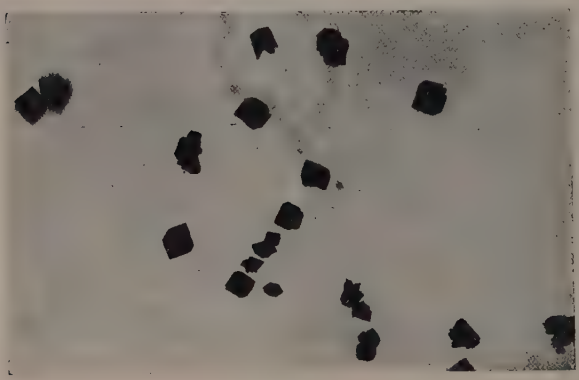


Fig. 3

Sottoposto ad analisi il composto ha dato risultati concordanti con la formula: $BiJ_3 \cdot 2HJ \cdot C_9H_{12}N$.

Se la stessa soluzione viene cautamente sottoposta a riscaldamento e addizionata ad una maggior quantità di reattivo, il composto che dapprima puo essersi formato scompare e dopo qualche tempo si formano bellissimi cristalli prismatici di color rosso cupo (figura 3). Se si impiegano soluzioni molto diluite di base è possibile ottenere direttamente

tale composto che precipita dopo qualche tempo. Esso sottoposto ad analisi diede risultati concordanti con la formula:

$$BiJ_3 \cdot HJ \cdot C_9H_{12}N \cdot 4H_2O.$$

Questo comportamento si presenta veramente caratteristico e permette un rapido e sicuro riconoscimento microchimico della β-fenil isopropilamina nelle sue soluzioni e nei preparati di impiego terapeutico.

Ho poi sottoposto ad analoghe ricerche la fenil 2-metil isopropilamina ed ho potuto constatare come tale base presenti con il medesimo reattivo un comportamento nettamente differenziato: si ottiene infatti a qualunque concentrazione tanto della sostanza che del reattivo stesso un solo composto cristallino, ben differenziato dai precedenti, costituito da cristallini prismatici allungati di color rosso granato (figura 4).

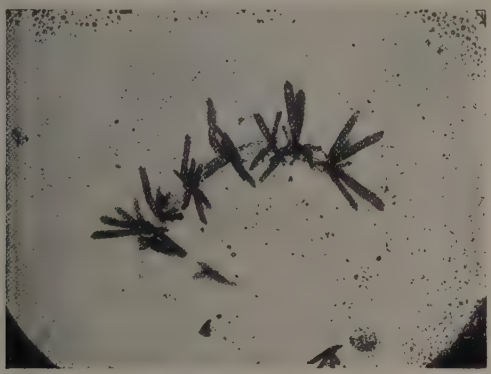


Fig. 4

Il composto, sottoposto ad analisi ha dato risultati concordanti con la formula: $BiJ_3 \cdot HJ \cdot C_{10}\text{-}H_{15}N \cdot 2\,H_2O$.

Jodobismutito di simpamina I°: per $BiJ_3 \cdot 2\,HJ \cdot 2\,C_9H_{12}N$

Bi	calcolato	18,72%	trovato	19,07%
J	„	56,90%	„	56,22%
N	„	2,51%	„	2,87%

Jodobismutito di simpamina II°: per $BiJ_3 \cdot HJ \cdot C_9H_{12}N \cdot 4\,H_2O$

Bi	calcolato	21,75%	trovato	21,17%
J	„	52,83%	„	52,80%
N	„	1,45%	„	1,65%

Jodobismutito di pervitina: per $BiJ_3 \cdot HJ \cdot C_{10}H_{15}N \cdot 2\,H_2O$

Bi	calcolato	23,14%	trovato	23,17%
J	„	56,19%	„	56,28%
N	„	1,55%	„	1,76%

A complemento di queste ricerche ho creduto opportuno studiare quale azione potesse esercitare su tali sostanze la soluzione di acido bromobismutico da me impiegato in precedenza per i derivati dell'acido nicotinico[9]. Solo da soluzioni nettamente acidificate con acido bromidrico la β-fenil isopropilamina lascia separare un prodotto cristallino omogeneo costituito da cristalli cubici di color giallo pallido (vedi figura 5). Il composto sottoposto ad analisi ha dato risultati concordanti con la formula: $BiBr_3 \cdot 3\ HBr \cdot \cdot 3C_9H_{12}N \cdot 3H_2O$.

Fig. 5

Ogni tentativo di isolare un derivato analogo dalle soluzioni di fenil 2-metil isopropilamina è riuscito vano e almeno nelle condizioni da me sperimentate non è possibile ottenere il relativo bromobismutito.

Tale comportamento differenziato delle due basi rende sufficientemente specifico l'impiego dell'acido bromobismutico per il riconoscimento

Fig. 6

della β-fenil isopropilamina, anche se tale reazione presenta una sensibilità minore, come è logico, di quella precedente.

Ho poi ritenuto opportuno indagare il comportamento rispetto agli stessi reattivi di altre basi aventi costituzione chimica analoga.

Meritano di essere ricordati i risultati ottenuti con l'efedrina.

Era già noto che per trattamento con il reattivo jodobismutico dalle soluzioni di efedrina si può ottenere un composto ben cristallizzato in sottili aghi di color rosso cupo, veramente caratteristici, come risulta dalla figura 6.

Per trattamento di soluzioni bromidriche di efedrina con acido bromobismutico è stato possibile ottenere la separazione di sottili lamine lucenti

Fig. 7

di color giallo oro, dotate di notevole insolubilità. Tale composto, (avente l'aspetto rappresentato nella figura 7) all'analisi ha dato risultati concordanti con la formula;

$$BiBr_3 \cdot 2\,HBr \cdot 2\,C_{10}H_{15}N\,O \cdot 3\,H_2O.$$

Dall'esame della letteratura chimica risulta che tale composto non era mai stato prima d'ora ottenuto.

Bromobismutito di simpamina: per $BiBr_3 \cdot 3\,HBr \cdot 3\,C_9H_{12}N \cdot 3\,H_2O$

Bi	calcolato	18,16%	trovato	18,04%
Br	„	41,66%	„	41,65%
N	„	3,65%	„	3,74%

Bromobismutito di efedrina: per $BiBr_3 \cdot 2\,HBr \cdot 2\,C_{10}H_{15}N\,O \cdot 3\,H_2O$

Bi	calcolato	21,01%	trovato	21,01%
Br	„	40,16%	„	40,03%
N	„	2,81%	„	2,96%

Riassunto

Viene proposto l'impiego di una speciale soluzione di jodobismutito potassico per il riconoscimento e la differenziazione microchimica della β-fenil-isopropil-amina e della N-metil-fenil-isopropilamina.

Mentre la prima di tali basi forma due composti aventi abito cristallino caratteristico e ben differenziati tra loro, con diversa costituzione chimica, dalla seconda si ottiene un solo composto dotato di forma cristallina caratteristica.

Inoltre mentre la β-fenil-isopropilamina dà con soluzione di acido bromobismutico un composto cristallino avente forma caratteristica e costituzione chimica ben definita, la N-metil-fenil-isopropilamina non reagisce con tale reattivo.

Zusammenfassung

Die Anwendung einer speziellen *Kalium-Wismutjodid*-Lösung wird für den mikrochemischen Nachweis und die Unterscheidung von β-Phenyl-isopropyl-amin und N-Methyl-phenyl-isopropyl-amin vorgeschlagen. Während die erstgenannte Base zwei Verbindungen bildet, die einen charakteristischen Kristallhabitus aufweisen und bei verschiedener chemischer Konstitution sich gut voneinander unterscheiden, erhält man aus der letzteren nur eine Verbindung, die sich durch eine charakteristische Kristallform auszeichnet. Während ferner das β-Phenyl-isopropyl-amin mit Bromwismutsäure eine Verbindung mit charakteristischer Kristallform und wohldefinierter chemischer Konstitution ergibt, reagiert das N-Methyl-phenyl-isopropyl-amin mit diesem Reagens nicht.

Summary

It is proposed that a special potassium-bismuth iodide solution be used for the microchemical detection and the differentiation of β-phenylisopropylamine and N-methylphenyl-isopropylamine.

The first of these bases forms two compounds, which display a characteristic crystal habit and which are readily distinguished because they have different chemical constitutions. On the other hand, the second base yields only one compound, which is marked by a characteristic crystal form. In addition, the β-phenylisopropylamine reacts with bromobismuthic acid to give a compound possessing a characteristic crystal form and a well defined chemical constitution, while N-methylphenyl-isopropylamine does not react with this reagent.

Résumé

On conseille l'emploi d'une solution spéciale d'iodure de potassium et de bismuth pour l'identification microchimique et la différenciation de la β-phényl-isopropylamine et de la N-méthylphénylisopropylamine.

Tandis que la première de ces deux bases donne naissance à deux combinaisons qui ont un aspect cristallin caractéristique et qui se différencient aisément l'une de l'autre par leurs constitutions chimiques, la seconde ne fournit qu'une seule combinaison qui se distingue par sa forme cristalline caractéristique. En outre, tandis que la β-phénylisopropylamine donne avec l'acide bromobismuthique une combinaison de forme cristalline caractéristique et de constitution chimique bien définie, la N-méthylphénylisopropylamine ne réagit pas.

Bibliografia

[1] *J. Davies*, Brit. Med. J. **1937**, 615.
[2] *M. H. Nathanson* — J. Amer. Med. Assoc. **108**, 528 (1937).

[3] *Q. Mingoia*, Ann. chim. farmaceutica **4**, 11 (1940); B. S. P. **48**, 202 (1941).
[4] *E. T. Illing*, Analyst **65**, 3 (1940).
[5] *K. H. Beyer* e *J. T. Skinner*, J. Pharm. Exp. Ther. **68**, 419 (1940).
[6] *P. Dessi*, Farmaco **5**, 32 (1950).
[7] *G. Vogel*, Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **41**, 420 (1952).
[8] *W. Heubner*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. **204**, 367 (1947).
[9] *Gilda Cavicchi*, Mikrochem. **36/37**, 1015 (1951).

Dall'Laboratorio chimico della Farmitalia, Milano

Determinazione di alcuni composti ossiantrachinonici a mezzo di titolazione in solventi non acquosi

Ada Anastasi, Ulisse Gallo ed **Enrico Mecarelli**

Con 2 figura

(Trasmesso 4 Giugno 1955)

Il grandissimo numero di pubblicazioni uscite negli ultimi anni sull'argomento delle titolazioni in solventi non acquosi dimostra l'importanza assunta da questi metodi che hanno trovato larga applicazione sopratutto nel controllo dei farmaceutici. E'noto a chi si occupa di analisi dei medicamenti quanto spesso accade di dover determinare sostanze diverse in presenza le une delle altre e difficilmente separabili, e quanto in questi casi, sia utile un metodo che all'accuratezza e precisione, alla semplicità e sensibilità unisca molto spesso anche la selettività che permette di eliminare lunghe e noiose separazioni preventive. Nel laboratorio degli autori molto spesso si è ricorso a questi metodi per risolvere diversi problemi analitici[1–4]; anzi essi sono entrati ormai nell'uso corrente per il controllo di routine di medicamenti allo stesso modo che le titolazioni di acidi e di basi in soluzione acquosa.

Il più universalmente usato dei metodi in ambiente anidro è quello delle titolazioni di basi sciolte in acido acetico a mezzo dell'acido perclorico in acido acetico, mentre meno diffusa è la titolazione di acidi sciolti in solventi alcalini, a mezzo di soluzioni titolanti alcaline.

Effettivamente il primo dei metodi possiede caratteri di semplicità del tutto simili a quelli delle titolazioni acquose mentre per il secondo si notano alcuni inconvenienti.

Ad esempio: 1) delle soluzioni normalmente usate per le titolazioni anidre è più semplice preparare la soluzione titolante acida a base di $HClO_4$ in acido acetico partendo dalla soluzione $HClO_4$ del commercio, che la soluzione alcalina di metilato sodico in benzolo a partire dal sodio metallico.

2) la soluzione di acido perclorico si conserva altrettanto bene che

le soluzioni acide in acqua ed il suo titolo non varia apprezzabilmente anche a distanza di alcuni mesi; la soluzione di metilato sodico invece si altera facilmente assorbendo anidride carbonica e deve essere frequentemente standardizzata.

3) la soluzione della sostanza basica da titolare in acido acetico può essere lasciata ed anche scaldata all'aria senza pericolo di alterazione mentre le soluzioni di acidi deboli in liquidi alcalini devono essere tenute accuratamente fuori del contatto dell'aria perchè assorbono molto facilmente anidride carbonica con conseguente aumento dell'acidità che si tradurrebbe in un errore in eccesso sulla quantità di sostanza trovata, Anche durante la titolazione è bene chiudere il recipiente nel quale si atrov la soluzione da titolare con un tappo forato per lasciar passare la punta della buretta ed eventualmente gli elettrodi a meno che una grande pratica dell'operazione non consenta di eseguirla con una rapidità che renda trascurabile l'errore dovuto all'inconveniente sopra citato.

Tali inconvenienti sono tuttavia trascurabili se si considera che con questo metodo si possono eseguire determinazioni come quelle in questione, che altrimenti sarebbero molto più laboriose e complesse.

Un metodo proposto per la determinazione dell'1-8 diossiantrachinone consiste infatti in una complicata copulazione del composto allo stato di sale potassico in soluzione accuratamente refrigerata, per mezzo del diazo derivato della nitroanilina contenuto a sua volta in una buretta scura anch'essa refrigerata con camicia di ghiaccio. Considerato il complicato metodo di preparazione dei reagenti facilmente decomponibili e quello di titolazione, in cui alla difficoltà di attuazione si somma la scarsa riproducibilità, è facile comprendere quali vantaggi presenti il metodo da noi proposto.

I composti esaminati sono l'1-8 diossiantrachinone l'1-8 diossi-3-metilantrachinone, e l'1-8 diossi-3-metilantrone che si usano in medicina per le loro note proprietà terapeutiche.

Il metodo permette di determinare le tre sostanze allo stato puro o contenute nelle specialità sia finite che in fase di lavorazione.

Modo di operare

Apparecchiatura: pH-metro, millivoltmetro o altro apparecchio per titolazione potenziometrica. La coppia di elettrodi vetro-antimonio, di cui 'lelettrodo di antimonio funziona da indicatore e quello di vetro da riferimento, si è rivelata come la più adatta per operare nell'ambiente basico da noi usato.

Reattivi e solventi: la soluzione titolante di metilato sodico 0,1 N è stata preparata secondo *Fritz Lisicki*[5] e standardizzata con acido benzoico sciolto in miscela benzene-metanolo. Come solvente si è trovato opportuno usare la piridina che dato il suo carattere basico esalta le proprietà acide dei composti in esame.

In questo solvente le curve di titolazione di questi composti fenolici. in acqua acidi debolissimi, hanno l'andamento delle curve di titolazione di acidi forti (fig.). Si osserva infatti per l'1-8 diossiantrachinone un

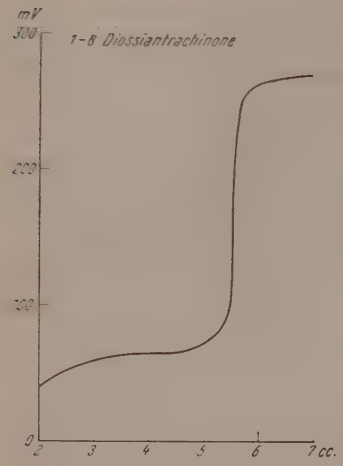


Fig. 1

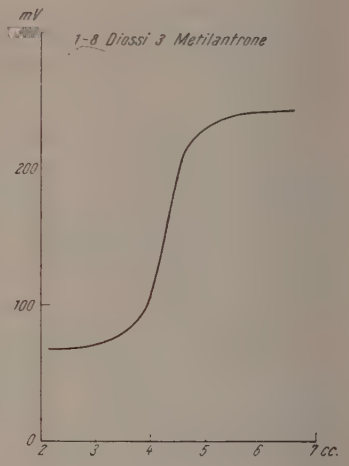


Fig. 2

salto di potenziale molto ampio e netto che può raggiungere anche i 200 mv. per un'aggiunta di 0,2 ml si soluzione titolante. Per il diossi metilantrone un po' meno ampio, ma sempre molto evidente, permette di cogliere ugualmente con grande esattezza il punto di equivalenza.

Tabella 1

1-8 diossiantrachinone (1)		
dovuto	trovato	errore %
0,08960	0,08980	+0,22
0,08830	0,08826	−0,05
0,10795	0,10776	−0,18
0,12430	0,12450	+0,18
0,11470	0,11504	+0,30
0,14400	0,14385	−0,104

Errore medio +0,27.

Tabella 2

1-8 diossi-3-metilantrone		
dovuto	trovato	errore %
0,11500	0,11534	+0,3
0,12700	0,12680	−0,15
0,13542	0,13576	+0,25
0,14733	0,14762	+0,20
0,09825	0,09813	−0,12
0,09907	0,09875	−0,32

Errore medio +0,16.

Procedimento: un'aliquota di 0,1 g circa di sostanza, si introduce in un piccolo beaker di forma alta e stretta con cc. 50 circa di piridina previamente neutralizzati con la soluzione di metilato. Si chiude il recipiente con adatto tappo di gomma per evitare il contatto con l'aria e si agita

per qualche tempo con agitatore elettromagnetico per facilitare la dissoluzione della presa da saggio. Si titola quindi con sodio metilato introducendo gli elettrodi e la punta della buretta nel beaker attraverso un tappo a tre fori che chiuda ermeticamente. Durante l'aggiunta di soluzione titolante la soluzione si colora fortemente in rosso, cosa che impedisce l'impiego degli indicatori.

I risultati riportati nelle due tabelle mostrano la grande riproducibilità del metodo.

(1) Per le prove è stata usata la „Farmistina" Farmitalia sia allo stato puro che sotto forma di specialità per uso veterinario costituita da una miscela al 95% con carbone animale.

Riassunto

E stato applicato il metodo di titolazione potenziometrica con metilato sodico a composti fenolici aventi formula simile come l'1-8 diossiantrachinone, l'1-8 diossi-3-metilantrachinone e l'1-8 diossi-3-metil antrone, di notevole importanza farmaceutica.

Come solvente si è usata la piridina e come rivelatori del punto di equivalenza una coppia di elettrodi vetro-antimonio non essendo possibile usare indicatori data la forte colorazione delle soluzioni.

Zusammenfassung

Die potentiometrische Titration mit Natriummethylat wurde zur Bestimmung von Derivaten herangezogen, deren Zusammensetzung dem 1,8-Dihydroxyanthrachinon, dem 1,8-Dihidroxy-3-methylanthrachinon und dem 1,8-Dihidroxy-3-methylanthron ähnlich ist.

Als Lösungsmittel wird Pyridin verwendet. Der Umschlagspunkt wird mit Hilfe eines Elektrodenpaares Glaselektrode-Antimonelektrode festgestellt, da die starke Eigenfärbung der Lösungen den Gebrauch von Indikatoren ausschließt.

Summary

Potentiometric titration with sodium methylate was used ton determine derivatives whose constitution is similar to that of 1,8-dihydroxyanthraquinone, 1,8-dihydroxy-3-methylanthraquinone and 1,8-dihydroxy-3-methylanthrone.

The solvent is pyridine. The change point was determined by means of an electrode pair: glass electrode-antimony electrode, since the intense self-color of the solutions excludes the use of indicators.

Résumé

Le titrage potentiométrique par le méthylate de sodium a été appliqué au dosage de dérivés dont la composition est semblable à celles de la 1,8-dihydroxyanthraquinone, de la 1,8-dihydroxy-3-méthylanthraquinone et de la 1,8-dihydroxy-3-méthylanthrone. On utilise la pyridine comme solvant.

Le point final de titrage est déterminé à l'aide d'un système électrode de verre: électrode d'antimoine car la forte coloration des solutions interdit l'emploi d'indicateurs.

Bibliografia

[1] *A. Anastasi, E. Mecarelli* e *L. Novacic*, Mikrochem. **40**, 53 (1953).
[2] *A. Anastasi, E. Mecarelli* e *L. Novacic*, Pharm. Acta Helv. **30**, 55 (1955).
[3] *A. Anastasi, U. Gallo* e *L. Novacic*, J. Pharm. Pharmocal. **7**, 263 (1955).
[4] *A. Anastasi, U. Gallo* e *L. Novacic*, Boll. chim. farm. **94**, 85 (1955).
[5] *J. S. Fritz* e *N. M. Lisicki*, Analyt. Chemistry **23**, 589 (1951).

Eidgenössische Milchwirtschaftliche Versuchsanstalt Liebefeld, Bern

Die mikrochemische Jodbestimmung in Milch und Milchprodukten

Von

H. Hänni

(Eingelangt am 20. März 1955)

Nachdem schon vor vielen Jahren *Fellenberg*[1] die wichtigsten Lebensmittel auf ihren Jodgehalt geprüft hatte und es schien, daß auf diesem Gebiete wenig mehr zu erkunden sei, erwachte doch in letzter Zeit das Interesse am Jodgehalt der Milch und der daraus hergestellten Produkte von neuem. Als in der Schweiz das Kochsalz zur Kropfprophylaxe allgemein mit einem geringen Zusatz von Kaliumjodid in den Handel gebracht wurde, zeigten sich gewisse Bedenken, daß die Verwendung dieses Jodsalzes bei der Käseherstellung zu unliebsamen Störungen führe. Obgleich es höchst unwahrscheinlich ist, daß der sehr geringe Kaliumjodidgehalt von 0,0005% im Salz irgendeinen Einfluß auf die Gärungsvorgänge im Käse ausüben kann, sind bis zum heutigen Tag die Klagen über Fehlergebnisse nicht ganz verstummt. Es stellt sich deshalb das Problem, die Verhältnisse durch genaue Jodgehaltsbestimmungen abzuklären.

Nun gibt es eine ganze Reihe von sehr gut ausgearbeiteten Verfahren zur Jodbestimmung, die meist im Hinblick auf die Kenntnis des Jodgehaltes im Blut geschaffen wurden. Die Hauptschwierigkeit des Jodnachweises liegt immer bei der Zerstörung der organischen Begleitstoffe, die so ausgeführt werden soll, daß dabei keine Jodverluste in Erscheinung treten. Hier wirkt sich besonders die Tatsache unliebsam aus, daß das Element Jod seine chemische Wertigkeit sehr leicht ändern kann. Es kann je nach den Umgebungsbedingungen sowohl in der negativ einwertigen, als auch in der positiv fünfwertigen Form auftreten und durchläuft bei Oxydations- und Reduktionsvorgängen immer die nullwertige Zwischenform, in der es als elementares Jod sehr leicht flüchtig ist. Diese Erscheinung kann nicht nur bei der Zerstörung der organischen

Substanz zu Jodverlusten führen, sondern ebenso bei der nachfolgenden Anreicherung kleiner Jodmengen vor der eigentlichen Bestimmung.

Die *Fellenberg*sche Methode, wobei die zu untersuchende Substanz mit Kaliumhydroxyd und Kaliumcarbonat aufgeschlossen wird, führt leicht zu Verlusten, weil zur vollständigen Verkohlung die Temperatur der Mischung so weit gesteigert werden muß, daß das gebildete Kaliumjodid sich teilweise verflüchtigt.

Schwaibold[2] hat die jodhaltige Substanz in Supremaxrohren im Sauerstoffstrom verbrannt und die gebildeten flüchtigen Jodverbindungen in Kaliumcarbonatlösung aufgefangen. Bei unseren Versuchen, Milch und Käse nach dieser Art aufzuschließen, entstanden stets sehr große Mengen von Teer, Pech und Wasser, die die weitere Isolierung des Jods unmöglich machten und schließlich zum Bruch des Rohres führten.

Pfeiffer[3] hat die viel bequemere nasse Veraschung gewählt. Die zu untersuchende Substanz wird in einem großen Rundkolben durch konzentrierte Schwefelsäure verkohlt. Aus einem Tropftrichter fließt langsam Perhydrol zu. Das Jod entweicht in elementarer Form oder als Jodwasserstoff, passiert einen glühenden Platinkontakt und wird in Kaliumcarbonatlösung absorbiert. Auch diese Methode gab bei unseren Versuchen keine brauchbaren Ergebnisse. Bei der Zersetzung der Käsemasse trat eine große Menge von flüchtigen Fettsäuren auf, die die Isolierung und Anreicherung des Jods störten.

Leipert[4] gab im Jahre 1933 ein anderes Verfahren an, das ebenfalls auf der Grundlage der nassen Veraschung beruht. Die Substanz wird dabei mit Schwefelsäure, Chromsäure und etwas Cerisulfat versetzt. Es tritt eine stürmische Reaktion ein, wobei die organische Substanz vollständig zerstört und das Jod in die positiv fünfwertige Form, nämlich zu Jodsäure, die nicht flüchtig ist, oxydiert wird. Hierauf wird in einer besonderen geschlossenen Apparatur mit arseniger Säure reduziert und das freiwerdende Jod mit Wasserdampf in eine Vorlage übergetrieben, wo es in alkalischer Flüssigkeit aufgefangen wird. Dieses Verfahren wurde mehrfach abgeändert und verbessert.

Den größten Fortschritt brachten wohl die Arbeiten von *Zacherl* und *Stöckl*[5], die die Methode vom Blindwert befreiten und eine vereinfachte, sehr wirksame Destillationsapparatur schufen. Das *Leipert*sche Verfahren, besonders in der Abwandlung nach *Zacherl* und *Stöckl*, erschien ganz besonders dienlich zur Lösung unserer Probleme. Die vollständige Zerstörung der organischen Substanz gelang mit dem Chromsäure-Schwefelsäure-Gemisch leicht. Wider alles Erwarten wurden aber stets zu kleine Jodwerte gefunden. Selbst wenn bekannte Mengen Jod in reiner Form nach der angegebenen Vorschrift behandelt wurden, ließ sich oft davon nur ungefähr die Hälfte wiederfinden. Es zeigte sich dann, daß bei der Reduktion mit arseniger Säure der größte Teil des Jodates in Jodwasser-

stoff übergeführt wurde und daß diese Verbindung nur bei sehr lange dauernder Destillation einigermaßen quantitativ in die Vorlage übertrat. Die weitgetriebene Destillation führte aber leicht zu einer Zersetzung der Schwefelsäure, wobei Dämpfe von Schwefeldioxyd in der Vorlage auftraten, die die weitere Verarbeitung ihres Inhaltes unmöglich machten.

Es zeigte sich nun nach vielen Versuchen, daß die Verhältnisse sofort günstiger wurden, wenn Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung nach *Riggs* und *Man*[6] zum Oxydieren und Zerstören der organischen Substanz und phosphorige Säure zur darauffolgenden Reduktion und Destillation zur Anwendung kamen. Der Oxydationsmischung zugesetzte bekannte Jodidmengen wurden ohne lange Versuche sofort quantitativ wiedergefunden. Eine Schwierigkeit bestand vorerst noch darin, daß mit Kaliumpermanganat die Fettstoffe nicht aufgeschlossen werden konnten. Nun ergab sich aber die Möglichkeit, einen alkalischen Voraufschluß bei verhältnismäßig niedriger Temperatur vorzunehmen, wobei die Fettstoffe weitgehend zersetzt wurden, so daß eine verhältnismäßig geringe Menge Kaliumpermanganat zur vollständigen Oxydation der Kohle ausreichend war.

Auf Grund dieser Erfahrungen und Überlegungen entstand die nachfolgend angegebene Vorschrift zur Jodbestimmung in schwer aufschließbaren Stoffen.

Arbeitsvorschrift

Reagenzien:

Kaliumcarbonat oder -hydroxyd, p. a.,
Natriumcarbonat, p. a.,
Kaliumpermanganat, p. a.,
Schwefelsäure, p. a., 18-n,
Schwefelsäure, p. a., 6-n,
Phosphorige Säure, ca. 50%ig,
Brom-Eisessig-Acetat-Lösung (nach *Zacherl* und *Stöckl*): 25 g Natriumacetat in 250 ml Eisessig + 1 ml Brom p. a.,
Kaliumjodidlösung, p. a., 2%ig,
Reagenslösung I: 0,9 g Sulfanilsäure in etwas warmem Wasser lösen. Nach Abkühlen 2,5 g Hydroxylaminsulfat und 30 ml Eisessig zufügen und auf 150 ml auffüllen.
Reagenslösung II: 150 mg α-Naphthylamin, p. a., in kaltem Wasser lösen, 30 ml Eisessig zusetzen und auf 150 ml auffüllen.

Der Aufschluß

5 g gut zerkleinerter Käse — bei anderen Stoffen ist das Vorgehen sinngemäß das gleiche — werden in eine Nickelschale eingewogen und mit 10 g eines Gemisches aus gleichen Teilen Natrium- und Kaliumcarbonat

versetzt. Man fügt soviel Wasser zu, daß ein dünner Brei entsteht, rührt mit einem Nickelstäbchen gut durch und läßt auf dem Wasserbad zur Trockne eindunsten. Hierauf erhitzt man die Schale vorsichtig über freier Flamme, so daß die organische Substanz langsam verkohlt. Wenn kein Rauch mehr entweicht, steigert man die Temperatur auf dunkle Rotglut und rührt mit dem Nickelstab gut durch, wobei die abgeschiedene Kohle mit dem schmelzenden Alkali innig vermischt werden soll. Es ist durchaus nicht nötig und unvorteilhaft, die schwarze Masse durch langes Erhitzen vollständig zu oxydieren, da die Kohle bei der nachfolgenden Behandlung mit Permanganat mit Leichtigkeit vollständig zerstört wird. Der Rückstand wird mit möglichst wenig warmem Wasser gelöst und in den bei der späteren Destillation benützten Kolben übergespült.

Jetzt wird die alkalische Lösung mit 2 g Kaliumpermanganat versetzt. Sobald sich dieses gelöst hat, fügt man vorsichtig unter Umschwenken 100 ml 18-n Schwefelsäure zu und führt die vollständige Oxydation der Kohle durch, indem man die Mischung solange kocht, bis die Temperatur der Flüssigkeit auf 175° gestiegen ist. Hierauf läßt man unter 100° abkühlen und verdünnt die Mischung mit 100 ml Wasser.

Reduktion und Destillation

Die weitere Verarbeitung der Flüssigkeit geschieht in einem Destillierapparat, der eine Tropfvorrichtung und eine Einrichtung zum Einleiten eines Transportgases aufweisen muß. Als sehr geeignet hat sich der Apparat nach *Zacherl* und *Stöckl* erwiesen.

Die Absorptionsvorlage des Destillierapparates wird mit 5 ml Brom-Eisessig-Acetat-Lösung und 5 ml Wasser beschickt. Man schließt den Kolben mit der Oxydationsmischung an und leitet einen schwachen Gasstrom (Luft, Kohlensäure oder Stickstoff) durch. Der Kolben wird über kleiner Flamme zum Sieden erhitzt. Wenn die Destillation beginnt, läßt man phosphorige Säure zutropfen. Der Braunstein beginnt sich aufzulösen, wobei die Flüssigkeit zunehmend durchscheinender und schließlich ganz hell und farblos wird. Jetzt stellt man die Zufuhr des Reduktionsmittels ab und destilliert weiter, bis etwa 50 ml Flüssigkeit übergegangen sind.

Bestimmung des Jods

Für die eigentliche Jodbestimmung stehen zwei Wege offen. Entweder läßt sich die bei *Zacherl* und *Stöckl*[5] beschriebene Mikrotitration mit Hilfe der *Gorbach*-Bürette ausführen. Oder aber man kann nach einem im hiesigen Institut ausgearbeiteten Verfahren, das auf Angaben von *Endres* und *Kaufmann*[7] zurückgeht, das Jod kolorimetrisch bestimmen. Hier sei nur dieser letzterwähnte Weg beschrieben. Nötig ist ein kleiner Destillierapparat mit leicht spindelförmigem Kolben, kurzem absteigen-

dem Kühler und kleinem Peligot-Rohr als Vorlage. Die einzelnen Teile werden durch Glasschliffe miteinander verbunden.

Die das Jod enthaltende Brom-Eisessig-Lösung wird quantitativ in den kleinen Destillierkolben übergespült. Man erhitzt über freier Flamme zum Sieden und kocht während 3 Minuten zum Vertreiben des Broms. Nach dieser Zeit gibt man ohne abzukühlen 5 Tropfen Kaliumjodidlösung und 1 ml 6-n Schwefelsäure (genau abmessen!) zu und schließt den Kolben so rasch als möglich an den Destillierapparat an. Die Vorlage enthält 5 ml Wasser und taucht in ein Gefäß mit Eiswasser. Man destilliert 2 Minuten lang lebhaft, entfernt die Flamme und gibt 2 ml Lösung I in die Vorlage, die dabei in der Kühlflüssigkeit verbleibt. Es ist wesentlich, daß die Destillation ziemlich rasch durchgeführt wird, weil sonst eigenartigerweise zu geringe Jodwerte erhalten werden. Die Vorlage bleibt mit den Lösungen noch 6 Minuten in der Kühlflüssigkeit. Hierauf gibt man 3 ml Lösung II zu. Nach einigen Sekunden beginnt sich eine schön rote Färbung zu bilden, die allmählich stärker wird und nach 10 Minuten ihre maximale Intensität erlangt. Diese Färbung ist bei richtiger Ausführung der Reaktion der ursprünglich vorhandenen Jodmenge proportional. Sie bleibt während einiger Stunden konstant. Das Absorptionsmaximum liegt bei 528 mμ. Bei dieser Wellenlänge ergibt 1 μg Jod noch eine Extinktion von 0,03, so daß es ohne weiteres möglich ist, noch geringere Mengen mit Sicherheit photometrisch zu bestimmen. Ein allfälliger geringer Jodgehalt der verwendeten Reagenzien wird dadurch unschädlich gemacht, daß man sich nach dem beschriebenen Verfahren (Aufschluß, Reduktion, Destillation, Farbreaktion) eine Vergleichslösung herstellt, die bei den photometrischen Messungen als Blindprobe dient.

Zusammenfassung

Die Bestimmung kleiner Mengen Jod in Stoffen, die zugleich Fett und Eiweiß enthalten, bietet besondere Schwierigkeiten. Die bisher gebräuchlichen Verfahren, die meist für die Bestimmung des Jodgehaltes im Blut ausgearbeitet worden waren, führen nicht ohne weiteres zum Ziel. Durch eine Kombination verschiedener Prinzipien ließ sich eine Methode finden, die auch bei schwer aufschließbaren Substanzen zu guten Ergebnissen führt. Beim angegebenen neuen Verfahren werden die zu untersuchenden Stoffe einer alkalischen Vorbehandlung bei verhältnismäßig niedriger Temperatur unterzogen. Es folgt die eigentliche Veraschung mit saurer Permanganatlösung. Aus diesem Gemisch wird das Jod durch Reduktion mit phosphoriger Säure und Destillation freigesetzt. Das freie Jod wandelt eine äquivalente Menge von Hydroxylamin in Nitrit um und dieses wird schließlich nach der bekannten Reaktion mit Sulfanilsäure und α-Naphthylamin kolorimetrisch bestimmt. Das Verfahren ist

allgemein anwendbar bei Stoffen, bei denen einfachere Methoden zur Isolierung des Jods versagen.

Summary

The determination of small amounts of iodine in substances containing both fat and albumin involves considerable difficulties. The methods commonly used till now, most of which have been elaborated for the determination of the iodine content in blood, do not always answer the purpose. By the combination of different principles, a method could be developed which yields good results even for substances difficult to analyse. The substance to be examined is previously submitted to an alkaline treatment at a relatively low temperature. Then it is incinerated with acid permanganate solution. The iodine contained in the ashes is set free by reduction with phosphorous acid and distillation. By the liberated iodine an equivalent amount of hydroxylamine is transformed into nitrite, which is finally determined colorimetrically by the ordinary reaction with sulphanilic acid and α-naphthylamine. The above procedure is fit for general application to substances where simpler methods for the isolation of iodine fail to work.

Résumé

Il est extrêmement difficile de déterminer de petites quantités d'iode dans des substances contenant en même temps de la graisse et de l'albumine. Les méthodes utilisées jusqu'à ce jour, mises au point en général pour déterminer la teneur en iode du sang, ne mènent pas sans autre au but. En combinant plusieurs principes, on a découvert un procédé donnant de bons résultats, même avec des substances qui s'analysent difficilement. En appliquant le nouveau procédé indiqué, les matières à analyser sont soumises à un prétraitement alcalin, à une température relativement basse. Vient ensuite l'incinération proprement dite avec une solution de permanganate acide. L'iode est libéré de ce mélange par réduction avec de l'acide phosphoreux et distillation. L'iode libre transforme une quantité équivalente d'hydroxylamine en nitrite et finalement ce dernier est déterminé colorimétriquement selon la réaction connue avec l'acide sulfanilique et l'α-naphtylamine. La technique peut être appliquée généralement pour des substances où des méthodes plus simples pour isoler l'iode échouent.

Literatur

[1] *Th. v. Fellenberg*, Mitt. Lebensmittelunters. u. Hyg. **14**, 229 (1923); **15**, 233 (1924); Biochem. Z. **139**, 444 (1923); **152**, 128, 145 (1924); **160**, 223 (1925).

[2] *J. Schwaibold* und *B. Harder*, Biochem. Z. **240**, 441 (1931).

[3] *G. Pfeiffer*, Biochem. Z. **256**, 214 (1932).

[4] *Th. Leipert*, Biochem. Z. **261**, 436 (1933).

[5] *M. K. Zacherl* und *W. Stöckl*, Mikrochem. **38**, 278 (1951).

[6] *D. S. Riggs* und *E. B. Man*, J. Biol. Chem. **134**, 193 (1940).

[7] *G. Endres* und *L. Kaufmann*, Z. physiol. Chem. **243**, 144 (1936).

Instituto de Investigaciones Microquímicas de la Universidad del Litoral, Rosario, Argentina

Sobre un nuevo complejo microquímico y su application a la investigación del Cu^{++}

Por

Juan Carlos Baró Graf

Con 4 figuras

(Recibido 1° de junio de 1955)

Entre las reacciones microquímicas relativas al Cu^{++} tenemos la clásica reacción de *Behrens*, que da lugar a la formación de cristales verdosos alargados, de sulfocianuro doble de mercurio y cobre; la que conduce a la integración de microcristales de color marrón, claro al oscuro, correspondientes a un complejo de yuxtaposición cupri-hexanitrito plúmbico potásico obtenido con disoluciones de acetato o nitrato de plomo y nitrito de potasio (o bien cloruro de potasio y nitrito de sodio saturado), ambas registradas como reacciones microcristalinas en el primer y tercer informe de la Comisión Internacional de Reacciones Reactivos analíticos nuevos[1]. Tanto la primera como la segunda han sido aplicadas exitosamente en microanálisis inorgánico, ya sea en minerales, aleaciones, toxicología, etc. Aparte de ellas, existen numerosas reacciones más, también microcristalinas como la obtenida con sulfocianuro de potasio y quinolina, o bien piridina *(Martini)*; la obtenida con salicilaldoxima en solución alcohólica *(Ephraim)*; con permanganato de potasio y piridina; con sulfocianuro de amonio y acridina; etc. etc.

Asimismo, hace algunos años, presenté otra nueva reacción para el ión cúprico utilizando como reactivo el ácido benzoico en piridina, el cual da lugar a la formación de microcristales característicos[2] ; con posterioridad estudié otra para el mismo catión[3] con ácido picolínico que produce un complejo interno, con el agregado que reacciona también con otros iones (bario, oro y platino) produciendo cristales de características diferentes.

Ahora bien, la nueva reacción que me ocupa se consigue utilizando como reactivo una solución saturada de ácido salicílico en piridina.

Como es sabido, el cloruro cúprico en solución más o menos concentrada origina con la piridina un precipitado celeste y en parte azulvioláceo, que se solubiliza en exceso de piridina dando una coloración violácea. Empero, el precipitado citado que está integrado por varillas o agujas no se produce frente a la piridina a diluciones cercanas al 1×100 de cloruro cú prico pero al añadir luego de la piridina mencionada, que en tales condiciones da negativo, unos cristales de ácido salicílico se originan microcristales característicos. Pude comprobar, después de numerosos ensayos, que utilizando como reactivo una solución casi saturada de ácido salicílico en piridina puede identificarse el ión cúprico en soluciones muy diluidas. Ordenando el estudio, coloqué sobre el portaobjeto una gota de una solución al 1×100 de cloruro cúprico y siguiendo la técnica corriente le agregué otra pequeñísima del reactivo mencionado más arriba. Se originaron cristales cuyas formas pueden observarse en la fotomicrografía figure 1. Puede, a su vez, notarse en el campo microscópico el desarrollo de tales agregados cristalinos, que adquieren formas más avanzadas, algunos maclados.

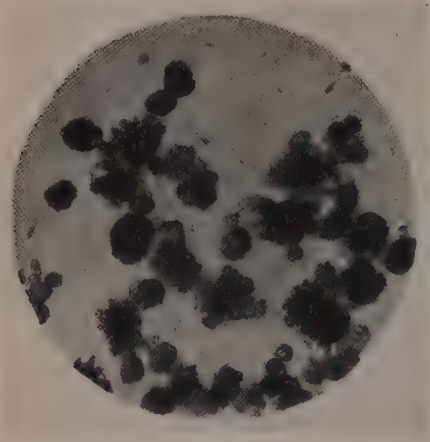


Fig. 1

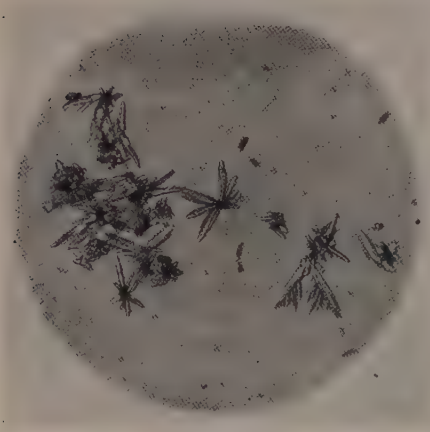


Fig. 2

En disoluciones del 1×1000 se obtienen dichas formas agrupadas con un grado mayor en su desarrollo como puede verse en la fotomicro-

grafía (figura 2) tomada con el mismo aumento y con la dilución citada. Al 1×10.000 la reacción resulta positiva y los cristales aparecen ordinariamente aislados, muchos como cristal perfecto (ver figura 3), presentándose a estas diluciones prácticamente incoloros. No obstante, no cabe duda de que interviene el cobre en estos cristales pues realicé una reacción topoquímica empleando el reactivo de *Behrens* (sulfocianuro de mercurio y potasio). Haciendo fluir por los bordes del cubre-objeto una pequeña gota del mismo y observando el campo microsc ópico pude notar nítidamente el ataque que se produce hasta la transformación en cristales verdosos marillentos característicos del nuevo compuesto formado. La figura 4 muestra un campo con microcristales en vías de transfor mación, obtenido previamente con diluciones del 1×10.000. Corresponde destacar, que en lo que a sensibilidad respecta, obtuve resultados positivos en diluciones superiores a la citada últimamente haciendo actuar, sobre una gota de la solución cúprica, una ínfima cantidad del reactivo colocada en el borde de dicha gota. Conseguí de esta manera llegar a un límite de identificación de 0,5 μg (L. l. = 0,5 μg) y una concentración límite de 1 : 100.000. Puede aumentarse, empero, utilizando la técnica de inclusión en geles o bien para grandes diluciones se puede proceder a eva porar, en un mismo lugar del porta, dos o más gotas a débil calor.

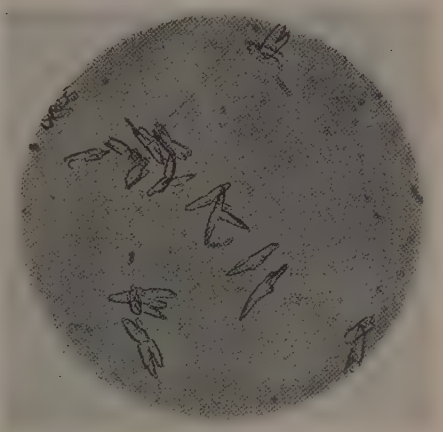


Fig. 3

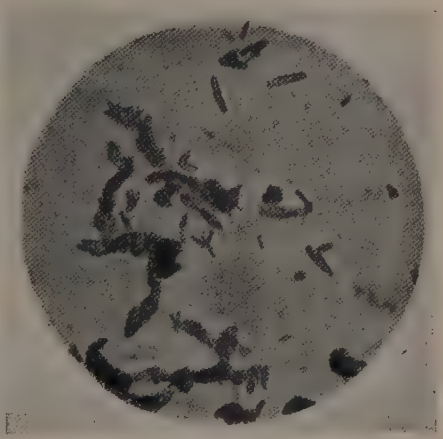


Fig. 4

Buscando aclarar acerca de la fórmula química a que responde el compuesto formado hice algunas reacciones topoquímicas y químicas. Procuré, utilizando una reacción microquímica que hallé hace unos 10 años al estudiar algunos heteropoliácidos[4], reconocer la intervención de la piridina en los cristales. Con una técnica similar a la anterior, empleando una solución saturada de ácido silico-túngstico pude observar las alteraciones en los microcristales; a su vez, recordando otra reacción microcristalina que estudiamos para la plata[5], mediante el salicilato de sodio, pensé en utilizarla a la inversa para caracterizar el ácido salicílico *(Behrens, Jurany)*, empleando una disolución concentrada de nitrato de plata la cual origina prismas incoloros monoclínicos y placas, también incoloras, de salicilato de plata. A tal efecto, hice fluir una pequeña gota de la disolución de nitrato de plata y estudié las alteraciones producidas en algunos microcristales presentes en el campo visual. Por otro lado, una disolución acuosa de salicilato de sodio frente a otra de cloruro cúprico (también ensayé con sulfato de cobre) provoca un precipitado que en el campo microscópico aparece amorfo; sin embargo, al agregar una pequeña cantidad de piridina por los bordes del cubre aparecen inmediatamente en el campo visual los cristales en cuestión. Ello tiende a corroborar la intervención de la piridina en el compuesto microcristalino hallado.

Cabe señalar, de paso, que también trabajé en el estudio de esta reacción del ión cúprico con otras sales como acetato, sulfato, etc., en lugar de cloruro, con resultados igualmente satisfactorios.

Los estudios teórico-prácticos realizados me llevan a pensar que se trata de un compuesto de salicilato cupri-piridínico, análogo al cupri-benzoato-piridínico, mencionado al principo.

Finalmente, estudié los microcristales hallados al microscopio de polarización comprobando su anisotropía; son fuertemente birrefringentes presentando el comportamiento de los cristales biáxicos, perteneciendo al sistema triclínico.

Resumen

El ácido salicílico disuelto a casi saturación en piridina constituye un buen reactivo para identificar al ión cúprico. El autor recurre, aparte de otros ensayos químicos, a reacciones topoquímicas a fin de establecer la naturaleza del complejo formado y concluye que el compuesto microcristalino es un cupri-salicilato-piridínico. Acompaña las fotomicrografías correspondientes y estudia la sensibilidad de la reacción que supera un límite de identificación de 0,5 μg y una concentración límite de 1 : 100.000. A su vez, estudia los microcristales a la luz polarizada y determina el sistema cristalino a que pertenecen.

Zusammenfassung

Fast bis zur Sättigung in Pyridin gelöste Salicylsäure ist ein gutes Reagens zur Identifizierung von Kupferionen. Nach anderweitigen chemischen Versuchen entscheidet sich der Verfasser für topochemische Reaktionen, um die Natur des entstandenen Komplexes festzustellen, und schließt daraus, daß es sich bei der kristallinen Verbindung um ein Kupfer-Pyridin-Salicylat handelt. Die Empfindlichkeit der Reaktion wurde geprüft: die Erfassungsgrenze beträgt 0,5 μg, die Grenzkonzentration von 1 : 100.000 wird übertroffen. Die in Mikrophotographien wiedergegebenen Kristalle wurden im polarisierten Licht untersucht und das zugehörige Kristallsystem ermittelt.

Summary

A practically saturated solution of salicylic acid in pyridine is a good reagent for identifying copper ions. After testing other chemical methods, the author has chosen topochemical reactions to determine the nature of the resulting complex, and concludes that the crystalline compound is a copper-pyridine-salicylate. The sensitivity of the reaction was tested; the identification limit is 0.5 μg, and the limiting concentration is more than 1 : 100,000. Microphotographs of the crystals are included. The crystals were studied in polarized light and their crystal system established.

Résumé

L'acide salicylique en solution pyridinique presque saturée est un bon réactif d'identification des ions cuivriques. Indépendemment d'autres essais chimiques, l'auteur a recours à des réactions topochimiques pour établir la nature du complexe formé et il conclut qu'il s'agit d'un composé microcristallin cupri-salycilatopyridinique.

Il présente les microphotographies correspondantes et étudie la sensibilité de la réaction qui permet de dépasser une limite d'identification de 0,5 μg et une concentration limite de 1/100 000. L'auteur étudie ensuite les microcristaux à la lumière polarisée et détermine le système cristallin auquel ils appartiennent.

Bibliographie

[1] *C. J. van Nieuwenburg, W. Böttger, F. Feigl, A. S. Komarovsky* y *N Strafford*, Tableaux des réactifs pour l'analyse minérale. Premier rapport de la Commission internationale des réactions et réactifs analytiques nouveaux de l'Union internationale de Chimie. Leipzig: Akademische Verlagsges. 1938; *C. J. van Nieuwenburg* y *P.-E. Wenger*, Tableaux des réactifs pour l'analyse minérale. Troisième rapport. Paris: Istra. 1948.

[2] *J. C. Baró Graf*, Public. Inst. Invest. Microquím. Rosario **12**, 29 (1948).

[3] *J. C. Baró Graf*, Public. Inst. Invest. Microquím. Rosario **17**, 251 (1953).

[4] *J. C. Baró Graf*, Public. Inst. Invest. Microquím. Rosario **8**, 21 (1944).

[5] *A. Martini* y *J. C. Baró Graf*, Public. Inst. Invest. Microquím. Rosario **3**, 00 (1939).

Aus dem Chemisch-physikalischen Institut der Bundesforschungsanstalt für Fleischwirtschaft in Kulmbach, Bayern

Über die Bestimmung von Calcium, Magnesium, Zink und Eisen in tierischem Gewebe

Von

Reiner Hamm

(Eingelangt am 26. März 1955)

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Hydratation der Muskelproteine erwies es sich als notwendig, diejenigen mineralischen Bestandteile des Muskelgewebes analytisch zu erfassen, die die Hydratation des Fleischeiweißes herabzusetzen vermögen. Als solche kommen im Muskel lediglich Calcium (ca. 5 mg%), Magnesium (ca. 25 mg%), Zink (ca. 3 mg%) und Eisen (ca. 3 mg%) in Betracht. Ich möchte in Kürze über unsere Bemühungen berichten, diese Elemente in der Lösung einer einzigen Veraschung quantitativ zu erfassen.

Der rascheste Weg zur Bestimmung von Calcium, Magnesium und Zink schien uns die bekannte, von *Schwarzenbach* und Mitarbeitern[1] eingeführte und vor allem von *Flaschka*[2] weiter entwickelte Methode der komplexometrischen Titration mit Äthylendiamintetraacetat zu sein. Dieses Verfahren wurde bereits auf die Analyse von Pflanzenaschen und Milch, nicht aber von *tierischen* Geweben angewendet, die ihres relativ hohen Phosphat- *und* Eisengehaltes wegen Schwierigkeiten eigener Art bereiten. Da Phosphat, gleichgültig, ob es als Ortho-, Meta- oder Pyrophosphat vorliegt, durch Fällung bzw. Komplexbildung der Erdalkalien die komplexometrische Titration stört, muß es zuvor abgetrennt werden. Hierzu erwies sich der bereits von *Mason*[3] bei Pflanzenaschen beschrittene Weg über Kationenaustauscher als geeignet. Gibt man die Lösung von Muskelasche in 0.1-n Salzsäure durch den Kationenaustauscher Lewatit S 100 (H^+-Form), so werden Calcium, Magnesium und Zink quantitativ zurückgehalten, während sich das gesamte Phosphat im Durchlauf findet. Durch zweimaliges Eluieren mit 5-n Salzsäure und Nachwaschen mit Wasser werden die Kationen quantitativ eluiert. Während die direkte komplexo-

metrische Titration des Calciums mit 0,01-m Titriplex gegen Murexid als Indikator keinerlei Schwierigkeiten bereitet, stört die mit der Elutionssäure eingeführte hohe Chlorionenkonzentration die Titration von Ca + Mg + Zn gegen Eriochromschwarz T empfindlich, indem sie durch Verfärbung ein Erkennen des Umschlagpunktes nahezu unmöglich macht. Diese störende Wirkung läßt sich beseitigen, wenn man den gegen Eriochromschwarz zu titrierenden aliquoten Teil des Eluates auf dem Sandbad zur Trockene einengt, mit 0,1-n Salzsäure aufnimmt und dann titriert. Nimmt man nach *Schwarzenbach*[1] diese Titration in Gegenwart von Kaliumcyanid vor, so werden infolge Komplexbindung des Zinks nur Calcium und Magnesium erfaßt. Indem man dann nach Erreichen des Umschlagpunktes nach Angaben von *Pribil* Chloralhydrat zusetzt, wird der Zinkcyanidkomplex zerstört und man kann nunmehr auch das Zink mit Äthylendiamintetraacetat bis zum erneuten Umschlag titrieren. Es sind also zur Erfassung von Calcium, Magnesium und Zink zwei Titrationen erforderlich.

Die Methode von *Körös*[4], zunächst Calcium gegen Murexid zu titrieren, dann das Murexid mit 5-n Salzsäure zu farblosen Abbauprodukten zu zersetzen, um dann in derselben Lösung nach Zugabe von Eriochromschwarz Calcium + Magnesium zu titrieren, scheitert nach unseren Erfahrungen an dem störenden Einfluß der hohen Chlorionenkonzentration.

Wir titrierten mit 0,01-n Titriplexlösung (Merck) aus der 200 μl fassenden Mikrobürette nach *Gorbach*[5], wobei pro Titrationsansatz etwa 10 μg Ca (ca. 25 μ l), 50 μg Mg (ca. 200 μl) und 6 bis 7 μg Zn (ca. 10 μl) vorlagen. Die Erkennung des Umschlagpunktes erfordert einige Übung. Es ist hierbei wichtig, daß stets gegen eine Vergleichslösung mit der Farbe des reinen Indikators titriert wird.

Eisen-II- und Eisen-III-Ionen werden aus 0,1-n salzsaurer Lösung quantitativ gegen die H-Ionen des Kationenaustauschers ausgetauscht und durch 5-n Salzsäure wieder eluiert. Gibt man jedoch die Lösung einer Trockenasche von Muskelgewebe in 0,1-n Salzsäure durch die Austauschersäule, so findet sich nahezu alles Eisen im Durchlauf wieder. Wie wir an Hand von Modellversuchen feststellten, beruht dieses Verhalten auf der Anwesenheit von Phosphat. Während Orthophosphat den Austausch des Eisens nicht beeinträchtigt, bildet Eisen mit dem in der Muskelasche stets im Überschuß vorhandenen Pyrophosphat Natrium-Eisen-Pyrophosphat-Komplexe, die so stabil sind, daß sie bei pH 2,0 und darüber Eisen nicht gegen die H-Ionen des Kunstharzes auszutauschen vermögen. 90 bis 95% des eingesetzten Eisens finden sich im Durchlauf, der Rest (5 bis 10%) zusammen mit Ca, Mg und Zn im stark salzsauren Eluat (pH 1,2). Der Gesamt-Eisengehalt läßt sich ohne weiteres in einer einzigen Bestimmung erfassen, wenn man aliquote Teile von Durchlauf und Eluat vereinigt und dann mit o-Phenanthrolin die Eisenmenge photometrisch ermittelt.

Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß das übliche Phenanthrolin-Verfahren nach *Heilmeyer*[6] durch Pyrophosphat (*nicht* durch Orthophosphat) durch starke Verzögerung der Farbentwicklung empfindlich gestört wird. Diese Schwierigkeit läßt sich durch Anwendung der Methode von *Bandemer* und *Schaible*[7] leicht umgehen, bei der man Phenanthrolin und Hydrochinon in stärker saurem Milieu zusetzt und erst dann mit Citratpuffer auf p_H 3 bis 5 einstellt.

Die Tatsache, daß durch Behandeln mit dem Kationenaustauscher der weitaus größte Teil des Eisens von Erdalkalien und Zink abgetrennt wird, ist für die komplexometrische Titration dieser Elemente von großem Vorteil, denn bekanntlich wird der Farbumschlag bei Gegenwart von Eisen unscharf. Die üblichen Kunstgriffe zur Maskierung des Eisens sind hier also unnötig.

Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen fanden wir, daß ganz allgemein eine *quantitative* Trennung des Eisens von den zweiwertigen Ionen Calcium, Magnesium und Zink möglich ist, wenn man der Analysenlösung Alkalipyrophosphat im Überschuß zusetzt — in der Asche von Muskelgewebe ist dieses *von Haus aus* enthalten —, auf p_H 4 einstellt und durch den Kationenaustauscher gibt. Dann findet sich das gesamte Eisen im Durchlauf, während die übrigen Kationen nach Elution mit 5-n Salzsäure quantitativ erfaßt werden können.

Es sei noch hingewiesen auf die Wahl der richtigen Veraschungsmethode, deren Bedeutung häufig unterschätzt wird. Für die gemeinsame Bestimmung von Ca, Mg, Zn und Fe kommt nur die trockene Veraschung in Platinschalen in Betracht, bei Verwendung von Quarzschalen erhielten wir zu niedrige Eisenwerte. Vermutlich bildet das Eisen mit dem Tiegelmaterial schwer lösliche Reaktionsprodukte. Während Standardmischungen aus den entsprechenden Kationen und Phosphat nach trockener Veraschung (in Platinschalen) nur teilweise in 0,1-n Salzsäure löslich sind, löst sich Fleischasche sehr leicht. Vielleicht wirken hier bestimmte, in der Asche anwesende Alkalisalze als Lösungsvermittler, so wie man z. B. schwer lösliche polymere Metaphosphate durch Zusatz von Alkaliphosphaten oder -sulfaten in Lösung bringen kann. Ein Salpetersäurezusatz zur Beschleunigung der Veraschung verbietet sich wegen der Bildung stark gelb gefärbter, isolierbarer Nitroverbindungen, deren Eigenfarbe zu hohe Eisenwerte ergibt. Aus ähnlichen Gründen erhält man — nach unseren Erfahrungen — bei nasser Veraschung mit Schwefelsäure-Salpetersäure zu hohe Eisenwerte. Hierbei ist die Konzentration an Nitroverbindungen meist so gering, daß ihre Farbe zwar mit bloßem Auge nicht mehr erkannt, wohl aber von dem Photometer registriert wird.

Abschließend sei der besprochene Analysengang noch einmal kurz zusammengefaßt: 1 bis 5 g Gewebe werden in Platinschalen bei 550° C im Muffelofen verascht, die Asche in 0,1-n Salzsäure gelöst, durch eine Säule

mit 1 bis 1,5 g Lewatit S 100 gegeben und mit Wasser nachgewaschen (= „Durchlauf"). Sodann wird mit 5-n Salzsäure eluiert und wiederum mit Wasser nachgewaschen (= „Eluat"). In einem aliquoten Teil des Eluats wird durch Titration gegen Murexid das Calcium, in einem weiteren aliquoten Teil nach Eindampfen zur Trockene und Aufnehmen mit 0,1-n Salzsäure durch Titration gegen Eriochromschwarz in Gegenwart von Kaliumcyanid Calcium + Magnesium und nach Zusatz von Chloralhydrat das Zink komplexometrisch ermittelt. Ferner wird je ein aliquoter Teil des Durchlaufes und des Eluates zusammengegeben und darin das Eisen mit o-Phenanthrolin nach der Methode von *Bandemer* und *Schaible*[7] photometrisch bestimmt.

Dem Fleisch zugesetztes Calcium, Magnesium, Zink und Eisen wurden nach dieser Methode quantitativ wiedergefunden. Der *mittlere Fehler* belief sich bei Calcium, Magnesium und Eisen auf $\pm$ 1,5%, bei Zink auf $\pm$ 2,6%. *Diese* Fehlerbreite umfaßt allerdings auch die Schwankungen, die mit der mangelnden Homogenität des Untersuchungsmaterials zusammenhängen und somit nicht in der Analysenmethode begründet liegen. Der für die Aufarbeitung der Aschen und die Bestimmungen notwendige Zeitaufwand beträgt etwa einen halben Tag. Durch Anwendung einer Serie von Austauschersäulen lassen sich innerhalb eines Tages von einer Person bequem 10 Aschelösungen aufarbeiten.

Es ist somit möglich, in einer einzigen Veraschungslösung den Calcium-, Magnesium-, Zink- und Eisengehalt in Gewebe nach Abtrennung des Phosphats durch zwei Titrationen und eine kolorimetrische Bestimmung zu ermitteln.

Zusammenfassung

Es wird über ein Verfahren berichtet, den Calcium-, Magnesium-, Zink- und Eisengehalt tierischen Gewebes (1 bis 5 g) in einer einzigen Veraschungslösung zu bestimmen. Die salzsaure Lösung der Trockenasche wird durch eine Kationenaustauscher-Säule gegeben und hierdurch Phosphat und 90 bis 95% des Eisens von Calcium, Magnesium und Zink getrennt. Die drei letzteren Elemente werden von der Säule unter Austausch zurückgehalten und nach Elution mit 5-n Salzsäure durch zwei komplexometrische Titrationen bestimmt. In dem mit dem Eluat vereinigten Durchlauf wird Eisen mittels der o-Phenanthrolin-Reaktion erfaßt. Auf die Veraschungsbedingungen und die Eisenbestimmung mit Phenanthrolin wird näher eingegangen.

Summary

A report is given of a method of determining the calcium, magnesium, zinc, and iron content of an animal tissue (1 to 5 g) in a single incineration solution. The hydrochloric acid solution of the dry ash is passed through a cation exchange column. In this manner, phosphate and 90 to 95% of the iron is separated from calcium, magnesium, and zinc. The three latter

elements are retained by the column by exchange. After elution with 5 *N* hydrochloric acid they are determined by two complexometric titrations. Iron is determined in the eluate combined with the rinsings; the o-phenanthroline reaction is employed. Details are given of the incineration conditions and the determination of the iron by means of phenanthroline.

Résumé

On décrit une méthode qui permet de déterminer sur une solution unique provenant de la calcination de tissus animaux (1 à 5 g) les teneurs en calcium, magnésium, zinc et fer. La solution chlorhydrique des cendres sèches est traitée sur une colonne d'un échangeur de cathions ce qui permet de séparer les phosphates et le fer (ce dernier dans une proportion de 90 à 95%), du calcium, du magnésium et du zinc.

Les trois derniers éléments sont retenus par échange sur la colonne et, après élution par l'acide chlorhydrique 5 N, ils sont dosés au moyen de deux titrages complexométriques. Dans le liquide qui s'est écoulé de la colonne, auquel on réunit l'éluat, on dose le fer par la réaction à l'orthophénanthroline. Les conditions de la calcination et le dosage du fer par la phénantroline sont l'objet de précisions détaillées.

Diskussion

H. *A. Holasek* (Graz): Sie finden Nitroverbindungen, wiewohl sie trocken veraschen; welche Temperaturen verwenden Sie dabei?

H. *R. Hamm:* Wir haben bei 550° verascht. Das hat uns zunächst auch überrascht; deswegen haben wir dann die Substanzen isoliert und nachgewiesen.

H. *A. Holasek:* Wir finden bei der Veraschung von Leichenteilen in schwefelsaurer Lösung mit Perchlorsäure und Salpetersäure öfter, daß solche Verbindungen auch der Schwefelsäure widerstehen. Nun höre ich zum ersten Mal, daß dies auch bei der trockenen Veraschung der Fall ist.

Literatur

[1] *G. Schwarzenbach, W. Biedermann* und *F. Bangerter*, Helv. Chim. Acta **29**, 811 (1946). *G. Schwarzenbach* und *H. Ackermann*, Helv. Chim. Acta **30**, 1798 (1947).

[2] *H. Flaschka*, Mikrochem. **39**, 38 (1952); Z. analyt. Chem. **138**, 332 (1953); Chemist-Analyst. **42**, 56, 84 (1953). *H. Flaschka* und *A. Holasek*, Z. physiol. Chem. **288**, 244 (1951); Röntgen- und Laboratoriumspraxis **6**, 72 (1953). *H. Flaschka* und *R. Püschel*, Z. analyt. Chem. **143**, 771 (1954). *A. Holasek* und *H. Flaschka*, Z. physiol. Chem. **290**, 57 (1952).

[3] *A. C. Mason*, Analyst **77**, 529 (1952).

[4] *E. Körös*, Ungar. Z. Chem. **59**, 137 (1953), zitiert nach Chem. Zbl. **1955**, 1805.

[5] *G. Gorbach*, Chem. Fabrik **14**, 387 (1941).

[6] *L. Heilmeyer* und *H. Plötner*, Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena: 1937. S. 8. *L. Heilmeyer, W. Keoderling* und *G. Stüme*, Kupfer und Eisen als körpereigene Wirkstoffe und ihre Bedeutung beim Krankheitsgeschehen. Jena: 1941.

[7] *S. L. Bandemer* und *P. J. Schaible*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **16**, 317 (1944).

[8] *R. Přibil*, zitiert nach *H. Flaschka*, Chemist-Analyst. **42**, 84 1953).

Aus der Chemischen Abteilung des Paracelsus-Institutes Bad Hall, Oberösterreich

Zur Methodik der Blutjodbestimmung

Von

H. Spitzy und H. Lieb

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 11. Mai 1955)

Die Bestimmung des Jodgehaltes in biologischem Material, besonders seine Differenzierung nach organischer und anorganischer Bindung in Serum bzw. Organgeweben, ist für das Studium des endogenen Jodhaushaltes und die Differentialdiagnose von Schilddrüsenkrankheiten von Bedeutung. Methodische Schwierigkeiten und die daraus resultierenden unzuverlässigen, oft widerspruchsvollen Ergebnisse stehen bislang der Anwendung eines solchen Verfahrens auf breiter Basis gleich anderen klinisch-chemischen Routinemethoden entgegen. Über 40 Verfahren — meist Modifikationen um wenige prinzipielle Möglichkeiten — sind in der Literatur beschrieben. Sie gliedern sich nach dem heutigen Stand in zwei Gruppen:

1. Alkalischer[1–4] oder saurer[5, 6] Aufschluß des biologischen Materials durch Veraschung, Wegfall einer Freilegung des Jods mit Hilfe der Destillation durch direkte Bestimmung des Jodgehaltes im Veraschungsrückstand. Die durch anwesende Fremdionen erhebliche Beeinflussung der Mikrotitration von Jod sowie der heute allgemein verwendeten Katalysereaktion für die Bestimmung des Jodids[7] weisen u. E. diesen Verfahren[3–6] nur den Charakter einer groben Orientierung zu.

2. Offene, saure Veraschung des biologischen Materials in Gegenwart von Chromsäure als Oxydans, Reduktion der dabei entstandenen Jodsäure und darauffolgende Destillation in alkalische Vorlagen zur Isolierung und kolorimetrischen bzw. titrimetrischen Bestimmung des Jods. Dieses Vorgehen gilt heute als zuverlässigstes Analysenprinzip und ist der grundlegenden Methodik von *Leipert*[8] zu danken. Zu diesem Verfahren wurden in der Folge eine Reihe geringer Abänderungsvor-

schläge und ergänzender Hinweise publiziert[9–11]. Die Jodbestimmung im Destillat erfolgt durch Mikrotitration, deren Erfassungsgrenze etwa bei 1 μg liegt. Die dadurch bedingte Mindestmenge an Serum (10 bis 20 ml pro Bestimmung) versuchten kürzlich *Zacherl* und *Stöckl*[11] dadurch zu reduzieren, daß sie eine Potenzierung zur 36fachen Jodmenge vornehmen, wobei allerdings die erforderliche zweite Destillation den Analysengang kompliziert.

Eine wesentliche Empfindlichkeitssteigerung des Analysenprinzips und damit Aussicht auf Anwendung bei experimentellen biologischen Reihenuntersuchungen brachte der Ersatz der Titration durch die photometrische Auswertung des katalytischen Einflusses von Jodid auf die Entfärbung von Cerisulfat durch arsenige Säure[7], da diese nur mehr Serummengen von 2 bis 3 ml für eine Jodbestimmung erfordert. Das Studium dieser Reaktion für praktische Belange sowie apparative Vereinfachungen des Destillationsvorganges sind das Verdienst von *Chaney*[12] sowie von *Talbot*[13], *Taurog* und *Chaicoff*[14] und schließlich *Barker*[15]. Zahlreiche weitere methodische und apparative Vorschläge[16–24] sowie kritische und ergänzende Beobachtungen zu einzelnen Verfahren[25–29] — allein in den letzten fünf Jahren — zeigen, daß keine Methode bei praktischer Anwendung ganz befriedigt.

Kürzlich hat nun *Klein*[30], im wesentlichen den letzterwähnten Autoren[13–15] folgend, ein Verfahren beschrieben, dessen Anwendung für unsere experimentellen Arbeiten erfolgversprechend schien, zumal wir u. a. mit den Methoden von *Sobel* und *Sapsin*[22] sowie *Zak* und Mitarbeitern[5] nicht reproduzierbare Werte erhielten. *Klein* (l. c.) folgt gleichfalls dem *Leipert*schen Grundprinzip. Die Jodsäure wird mit phosphoriger Säure reduziert, das Abdestillieren des Jods erfolgt in einer neu vorgeschlagenen Apparatur. Die hochleistungsfähige katalytische Jodidbestimmung erlaubt auch nach unseren Erfahrungen noch die Erfassung von 0,002 μg Jodid in der alkalischen Vorlage, wodurch der Autor mit 2 ml Plasma bzw. Serum das Auslangen findet. Die Bestimmung erfaßt das Gesamtjod bzw. das biologisch besonders interessierende eiweißgebundene Jod = PBI (protein bound Iodine) im Trichloressigsäure-Präzipitat.

Für unsere Untersuchungen stand uns eine Originalapparatur nach *Klein (Beckmann)* der Fa. Mollenkopf, Stuttgart, zur Verfügung. Trotz genauer Einhaltung der vom Autor gegebenen Arbeitsvorschrift gelang es uns nicht, analytisch exakte und verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Wir beobachteten daher mit *Reese* und *Skrube* das Verfahren unter Heranziehung von ^{131}J in seinen einzelnen Abschnitten (katalytische Jodbestimmung, Destillation bzw. Reduktion des bei der Veraschung freigelegten Jods, Veraschung). Wenn wir über die so gewonnenen Erfahrungen berichten (siehe auch *Spitzy*[31]), wollen wir nicht zum „Blühen der Modifikationen" (*Leipert*[32]) beitragen, sondern Mißerfolge bei An-

wendung des *Klein*schen Verfahrens hintanhalten und einige offene Fragen bei der Blutjodbestimmung aufzuklären versuchen. Dem Charakter dieser Mitteilung entsprechend berichten wir nur zusammenfassend:

1. Die katalytische Jodbestimmung entspricht den analytisch an sie gestellten Anforderungen. Noch 0,002 μg Jodid in 6,3 ml sind bestimmbar.

2. Die Reduktion der bei der Veraschung entstandenen Jodsäure und die Destillation in die alkalische Vorlage hielt unseren Überprüfungen

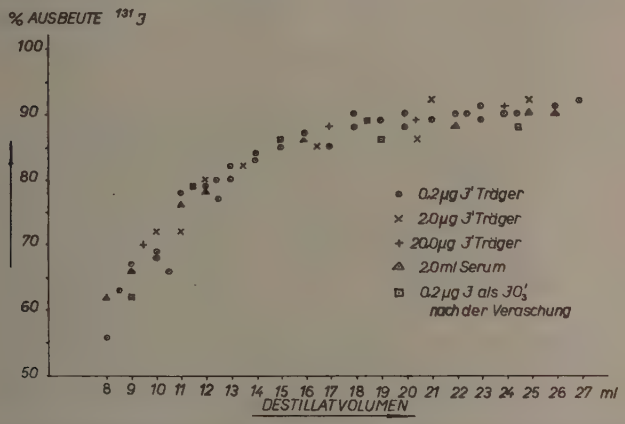


Abb. 1. ^{131}J-Ausbeute bei konstanter Destillationsdauer (15 Minuten) und variierender Heizintensität

nur zum Teil stand. Auch andere Autoren[17, 20] bezeichnen diese Phase als kritisch. Bei der von *Klein*[30] angegebenen Destillationsdauer von 15 Minuten — in den ersten 5 Minuten Zusatz der phosphorigen Säure zur Reduktion — erhält man je nach Heizintensität Destillate von 8 bis 27 ml (Abb. 1).

Vor der Veraschung zugesetztes, markiertes Jodid mit Trägermengen von 0,2, 2,0 und 20,0 μg sowohl mit und ohne Serum, als auch zugesetztes markiertes Jodat nach der Veraschung mit und ohne Serum ergaben bei der konstanten Destillationsdauer von 15 Minuten Aktivitätsausbeuten von 56 bis 92%. Die Kurve nähert sich asymptotisch 100% und liegt bei dem von *Klein* angegebenen Destillatvolumen (10 bis 12 ml) bei nur 79%. Die Untersuchungen mit Radiojod ergaben ferner, daß 1,4 bis 2,0% an der Glasapparatur adsorptiv haften. Der jeweils auf 100% fehlende Rest wurde in der Veraschungslösung gefunden. Mehrfache Wiederholung der Destillation aus denselben Veraschungslösungen ohne neuerlichen Zusatz von Reduktionsmittel ergaben bei gleicher Destillationszeit und -Intensität bis zu dreimaliger Wiederholung noch

erfaßbare Jodausbeuten. Erhöhter Zusatz von phosphoriger Säure sowie neuerliche Zugabe des Reduktionsmittels bei Destillationswiederholungen hatten gleich der Verwendung von Stickstoff als Trägergas keinen Einfluß. Auch mit anderen Reduktionsmitteln wie arsenige Säure, Oxalsäure, konnten keine Verbesserungen erzielt werden.

Obwohl unsere auf 100% stimmenden Aktivitätsmessungen bereits zeigten, daß sich kein Jod der Absorption in der alkalischen Vorlage entzieht, folgten wir den viel diskutierten Vorschlägen von *Barker*[15], *Thomas*[17], *Kirkpatrick*[21], der Vorlagenflüssigkeit Natriumsulfit bzw. Arsenit zur Reduktion zuzusetzen. Vergleichsmessungen mit ^{131}J ergaben aber keinen Unterschied gegenüber der alleinigen Verwendung von Natronlauge.

Wir destillieren bei unseren Bestimmungen 15 Minuten bei solcher Heizintensität, daß Destillate von 18 bis 19 ml resultieren und vermehren, wie die Ausbeutekurve zeigt, die erhaltenen Werte um 10%.

3. *Moran*[28] stellt fest, daß Wasserstoffperoxyd — der schon reduzierten Veraschungslösung zugeführt — die Jodausbeute vergrößert, und belegt dies mit erhöhten Werten, die er bei der katalytischen Jodbestimmung erhält. Der Autor sieht die Ursache darin, daß die Jodsäure durch Phosphit bzw. Arsenit nicht vollständig zu Jodwasserstoffsäure reduziert wird. Daher gelange Hypojodit, Jod und Jodwasserstoffsäure bei der Destillation in die alkalische Vorlage, wo sich Jodat neben Jodid und Hypojodit bildet. Jodat würde aber nach *Moran* durch die katalytische Jodbestimmung nicht erfaßt, wodurch zu niedere Jodwerte gefunden werden. Der Zusatz von Wasserstoffperoxyd bewirkt nun nach Meinung des Autors die vollständige Reduktion der Jodsäure in der Veraschungslösung zu Jodwasserstoffsäure, die durch die katalytische Jodbestimmung in der Vorlage quantitativ erfaßt wird.

Unsere Untersuchungen mit ^{131}J führten hingegen zu dem Ergebnis, daß Wasserstoffperoxydzusatz die Jodausbeuten nicht erhöht und diese der Kurve in Abb. 1 folgen. Bei vergleichenden katalytischen Bestimmungen in wäßrigen Lösungen von Jodid und Jodat mit identischen Mengen Jod zeigte sich weiters, daß Jodat durch arsenige Säure bei dem gegebenen Säuregrad reduziert wird und damit gleichfalls quantitativ durch die Katalysereaktion erfaßbar ist (siehe auch *Zak* und Mitarbeiter[5]).

Die Gegenüberstellung von ^{131}J-Ausbeuten und Werten der photometrischen Jodbestimmung ließ erkennen, daß unbekannte, die Katalysereaktion störende Substanzen, insbesondere bei wäßrigen Jodlösungen und stark wasserhaltigen Materialien, in das Destillat übergehen (Tabelle 1).

Zusätze von bekannten Jodidmengen zur Vorlageflüssigkeit stellten dies unter Beweis. Setzten wir nach *Moran* (l. c.) Wasserstoffperoxyd nach der Reduktion zu, so war eine Beseitigung dieser störenden Ein-

Tabelle 1

		ohne H_2O_2	mit H_2O_2 (1 ml, 3,5%) mit H_2O_2 (1 ml, 17,5%) mit Glykokoll (3 ml, 12%) mit Glykokoll (3 ml, 12%) und H_2O_2 (1 ml, 3,5%)
I	Blindwert	20—75%	konstante Werte
	Gefundenes Jod nach Zusatz bekannter J^--Mengen zum Destillat von I	20—80%	100%
II	Gefundenes Jod von bekannten Mengen Thyroxin, Dijodtyrosin, NaJ in wäßriger Lösung	20—75%	100% ± 10
	Gefundenes Jod nach Zusatz bekannter J^--Mengen zum Destillat von II	20—80%	100%

flüsse festzustellen. Deren Ausmaß variierte mit dem Volumen der zur Destillation gelangenden Veraschungslösung und zeigte sich auch abhängig von der Dauer und angewandten Temperatur bei der Veraschung. Wie aus der Tabelle 1 weiter hervorgeht, erübrigt ein Wasserstoffperoxydzusatz auch die Zugabe eines organischen Trägers bei der Jodbestimmung in stark wasserhaltigen Materialien — in der Regel Glykokoll. Zahlreiche Autoren beobachten, daß bei der Jodbestimmung in solchen Proben ohne Zusatz organischer Substanz in der Größenordnung des Serums Jodverluste von 15 bis 100% auftreten (*Klein*[33], dort auch andere Literatur).

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß wir den Blindwert bei unseren Bestimmungen stets durch Zusatz von Wasserstoffperoxyd ermitteln und kontrollieren. Bei sorgfältig gereinigten p. a.-Reagenzien (Merck) finden wir etwa 0,036 μg Jod und liegen damit übereinstimmend mit *Middlesworth*[27] und entgegen *Klein*[30] in der Größenordnung der in der Regel in den Proben zu bestimmenden Jodmengen. Gegenüber konstanten Werten bei Zusatz von Wasserstoffperoxyd bzw. Glykokoll erhalten wir ohne diesen schwankende Werte (Tabelle 1).

4. Zur Klärung, ob bei der sauren offenen Veraschung durch Schwefel- und Chromsäure, wie mehrfach besonders bei stark wasserhaltigen Materialien behauptet wird, Jodverluste entstehen, prüften wir auch diese Frage mit Radiojod in verschiedener Weise. Es ergab sich ins-

besondere, daß bei den Bedingungen von *Klein*[30] und *Moran*[28] kein Jod verlorengeht. Überschreitet man die dabei erhaltenen Maximaltemperaturen und verascht sogar bis 250°C weiter, so ist noch immer alles Jod in der Veraschungslösung auffindbar. Dies trifft für Jod sowohl in anorganischer als auch in organischer Bindung zu. Mit dieser Feststellung und durch unsere Ausbeutekurve aus wässerigen Jodidlösungen (Abb. 1) bestätigt, glauben wir, die von *Klein*[33] vertretene Ansicht hinreichend widerlegt zu haben, wonach der Kohlenstoff der organischen Verbindungen (z. B. Glykokoll) als Adsorbens für das Jod gebraucht wird, damit bei dessen stufenweiser Oxydation bis zur Jodsäure kein J_2 entweichen kann.

Nesh und *Peacock*[29] schlagen zur quantitativen Bestimmung von eiweißgebundenem Jod nach der Methode von *Barker*[5] vor, radioaktives Jodid zum gelösten Proteinpräzipitat zuzusetzen und durch γ-Strahlenmessung im Destillat den Jodwert, den sie bei der kolorimetrischen Jodbestimmung erhalten. zu berichtigen. Unsere Untersuchungen zeigen, daß eine Korrektur des am Photometer abgelesenen Jodwertes durch Ausbeutebestimmungen mit Radiojod nur bedingt zulässig ist, da sie etwaige störende Substanzen bei der katalytischen Reaktion nicht berücksichtigt. Dem Vorgehen von *Caraway*[26], einem Anteil des bei der Bestimmung anfallenden Destillates eine bekannte Jodidmenge zuzusetzen, ist ebenfalls nur beschränkt zuzustimmen; allfällige Hemmungen bzw. Förderungen der katalytischen Reaktion können so weitgehend in Rechnung gesetzt werden, doch bleibt die bei der Destillation erhaltene Jodausbeute unberücksichtigt.

Durch Beachtung all dieser Umstände gelang es uns, die Bestimmung des Gesamt- und eiweißgebundenen Jods sowohl in Serum als auch in sonstigen stark wasserhaltigen Materialien in unsere experimentellen Untersuchungen mit Erfolg einzubauen. Besonderes Augenmerk ist dabei auf die völlige Jodfreiheit der verwendeten Glasgefäße und Geräte zur Blutabnahme zu richten. Die Normalwerte des Gesamtjods im Serum finden wir von 4 bis 10 μg%, wovon 3,5 bis 8 μg% durch Trichloressigsäure fällbar sind. Damit schließen wir uns den seit Jahren als real angesehenen „niederen" Blutjodwerten an und können auf Grund unserer eingehenden Untersuchungen mit Radiojod den kürzlich von *Schittenhelm* und *Bauer*[34] abermals zur Diskussion gestellten „hohen" Jodwerten im Serum (30 μg%) nicht beipflichten.

Im Vorjahr (1954) publizierte *Klein*[35] eine einfache Methode zur Bestimmung des anorganischen Blutjods, die auf direktem Ansatz der katalytischen Jodbestimmung im Flüssigkeitsüberstand des mit Trichloressigsäure ausgefällten Serumeiweißsedimentes beruht. Dies bedeutet eine wesentliche Vereinfachung; wurde doch bislang das anorganische Blutjod als Differenz aus Gesamtjod und eiweißgebundenem

Jod rechnerisch ermittelt, wodurch zwei Bestimmungen mit Veraschung und Destillation erforderlich waren. Dieses Schnellverfahren hat sich bei uns bewährt, doch ist in Ergänzung zu *Klein* (l. c.) darauf zu achten, daß Serum von sich aus — offenbar durch reduzierende Substanzen — in der Lage sein kann, Cerilösungen zu entfärben. Dieser Umstand ist in Rechnung zu setzen.

Auch die direkte Bestimmung des Harnjodids ist auf dieser Basis nach unseren Untersuchungen bei Ausscheidungen von mehr als etwa 1 mg im 24-Stunden-Harn möglich.

Über die Leistungsfähigkeit der einzelnen Methoden geben Beispiele in Tabelle 2 Aufschluß. Daraus ist zu entnehmen, daß die Jodbestimmung

Tabelle 2

Kälberserum	Gesamt-Jod		Eiweißgebundenes Jod	
	µg	µg%	µg	µg%
0,5 ml	0,043	8,6	0,035	7,0
0,5 ml + 0,08 µg J als Thyroxin	0,124	—	—	—
1,0 ml	0,085	8,5	0,062	6,2
2,0 ml	0,175	8,8	0,125	6,3
3,0 ml	0,260	8,7	0,190	6,3
Einfluß von Trichloressigsäure (TE), vor der Veraschung zugesetzt	1,8 ml 68%ige TE mit H_2O_2		ohne TE mit H_2O_2	
Blindwert	0,036 µg J		0,035 µg J	
0,4 µg J als Thyroxin	0,38 µg J		0,42 µg J	
Harn	µg J bei direkter katalytischer J^--Bestimmung		µg J bei Bestimmung durch Destillation (H_2O_2-Zusatz)	
4 ml (1 : 1000)	0,016		0,016	
4 ml (1 : 200)	0,081		0,084	

auch in Gegenwart von erheblicher Menge Trichloressigsäure bei richtig gelenkter Veraschung möglich ist.

Ein Beispiel der praktischen Anwendung der hier nur skizzierten Verfahren zeigt Abb. 2.

Zum Studium des Verhaltens von anorganischem und organisch-gebundenem Serumjod sowie des Harnjodids bei einer Trinkkur wurde durch 8 Tage (E. W., ♂, 28a, Glaskörpertrübung) je 10 mg Jodid (als NaJ) markiert mit 8 µC ^{131}J in 100 ml 0,9%iger Kochsalzlösung

täglich verabreicht. Die Bestimmung des Harnjodids erfolgte durch direkte katalytische Reaktion in Verdünnungen (1 : 250 bis 1 : 1000) und wurde jeweils durch Aktivitätsmessung auf ihre Richtigkeit geprüft. Das verabreichte Jodid wird innerhalb von 24 Stunden — wie bekannt —

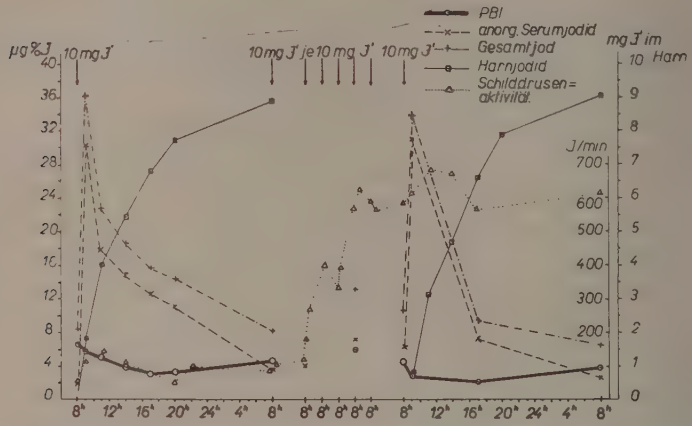


Abb. 2. Verhalten von anorganisch- und organisch-gebundenem Serumjod, sowie Harnjodid bei einem Trinkversuch über 8 Tage

fast zur Gänze ausgeschieden. Bemerkenswert ist das Absinken des organisch gebundenen Jods von 6,6 µg% auf 3,9 µg% (*Plummer*-Effekt) im Verlauf von 8 Tagen und besonders die Feststellung, daß eine akute Jodidgabe (10 mg) innerhalb von 9 Stunden den Gehalt an eiweißgebundenem Jod (PBI) im Serum auf die Hälfte zu vermindern in der Lage ist.

Die ausführliche Darstellung der Untersuchungsergebnisse sowie der genauen Arbeitsvorschriften wird in Kürze erfolgen.

Zusammenfassung

Nach einer einleitenden Übersicht über die prinzipiellen Möglichkeiten zur Jodbestimmung in biologischem Material und ihre methodische Bearbeitung in den letzten Jahren werden zusammenfassend Beobachtungen allgemeiner Art bei der Erfassung des Blutjods und seiner Fraktionen, sowie im besonderen Erfahrungen mit der Methode nach *Klein* mitgeteilt. Durch unverwertbare Ergebnisse veranlaßt, wurden die einzelnen Phasen dieser Jodbestimmung — Katalysereaktion, Destillation bzw. Reduktion des bei der Veraschung freigelegten Jods, Veraschung — mit ^{131}J kontrolliert. Die so ermittelte Ausbeutekurve für Jod ergibt bei 15 Minuten währender Destillation in der alkalischen Vorlage, 10 bis 12 ml nach *Klein*, nur 79% der vorgegebenen Jodmenge. In der Literatur vorge-

schlagene Zusätze von Reduktionsmitteln zur alkalischen Vorlageflüssigkeit sind dabei ohne Einfluß. Wasserstoffperoxyd *(Moran)* bewirkt keine Ausbeutesteigerung, sondern verhindert das Übergehen unbekannter, die Jodkatalysereaktion störender Substanzen. Weiters erübrigt sein Zusatz unmittelbar nach Reduktion der in der Veraschungslösung entstandenen Jodsäure das Vorhandensein organischer Trägersubstanz bei der Jodbestimmung in stark wasserhaltigen Materialien. Auch bei der sauren Veraschung solcher Proben entstehen im Gegensatz zu anderen Autoren selbst bei Temperaturen bis 250° C keine Jodverluste. Zur Ermittlung des Blindwertes der Bestimmung ist die Zugabe von Wasserstoffperoxyd nach der Reduktion oder Glykokoll vor der Veraschung erforderlich. Er beträgt bei sorgfältig gereinigten p. a.-Reagenzien (Merck) etwa 0,036 μg Jod.

Die Ergebnisse bestätigen abermals die „niederen" Serumjodwerte (4 bis 10 μg%, davon 3,5 bis 8 μg% durch Trichloressigsäure fällbar) entgegen *Schittenhelm* und *Bauer* (30 μg%).

Eine praktische Anwendung (Trinkversuch über 8 Tage) der Bestimmung von anorganisch und organisch gebundenem Jod im Serum, sowie einer neuen Schnellmethode zur Erfassung des Harnjodids (direkte Jodkatalysereaktion in Harnverdünnungen, für mehr als etwa 1 mg Jodid im 24-Stunden-Harn anwendbar) stellen unter Berücksichtigung der gewonnenen Erfahrungen die Brauchbarkeit der Verfahren unter Beweis.

Summary

After an introductory survey of the fundamental possibilities of determining iodine in biological material and their methodical development in the past few years, there follows a summary of the observations of a general nature regarding the determination of blood iodine and its fractions together with a report in particular of the method suggested by *Klein*. Because of results that could not be interpreted, the various phases of this method of determining iodine-catalysis reaction, distillation and reduction of the iodine liberated by ashing, ashing — were checked with ^{131}I. The yield curve for iodine worked out in this manner, after 15 minutes of distillation, shows, in the alkaline receiver, 10 to 12 ml after *Klein*, only 79% of the quantity of iodine known to be present. No effect was exerted by the addition of the materials suggested in the literature as suitable reducing agents to be included in the alkaline receiving liquid. No increase in the yield was obtained with hydrogen peroxide *(Moran)*, but it prevents the passing over of unknown substances which interfere with the iodine catalysis reaction. Furthermore, its addition directly after reduction of the iodic acid produced in the ashing liquor, makes unnecessary the presence of organic carrier substances in materials which contain much water. Likewise, in the acid ashing of such samples, there is no loss of iodine even at temperatures up to 250°, a fact that is not in harmony with the statements of other writers. When determining the blank value of the determination, it is necessary to add hydrogen peroxide after the reduction of glycocoll prior to the ashing. The blank

amounts to approximately 0.036 μg of iodine when carefully purified reagents (Merck) are employed. The results confirm once more the "low" serum iodine values (4—10 μg%, of which 3.5—8 μg is precipitable by trichloroacetic acid) as contrasted to the value given by *Schittenhelm* and *Bauer* (30 μg%).

A practical application (drinking trial over a period of 8 days) of the determination of inorganic and organic bound iodine in serum, as well as a new rapid method for determining the urine iodine (direct iodine catalysis reaction in urine dilutions, applicable to more than about 1 mg iodide in 24 hours urine) demonstrate the usability of the procedure.

Résumé

Après avoir examiné les possibilités de principe de dosage de l'iode dans les milieux biologiques et leur exploitation méthodique pendant ces dernières années, les auteurs rendent compte de l'ensemble de leurs observations d'ordre général concernant les déterminations de l'iode sanguin et de ses fractions ainsi que de certaines observations particulières effectuées lors de l'application de la méthode de *Klein*. L'obtention de résultats inutilisables a donné lieu au contrôle des différentes phases du mode opératoire de dosage de l'iode, à l'aide de l'isotope ^{131}I, savoir: la réaction catalytique, la distillation ou la réduction de l'iode libéré lors de la calcination, et l'incinération. La courbe de rendement en iode ainsi obtenue montre qu'après une distillation de 15 minutes dans l'allonge alcaline (10 à 12 ml d'après *Klein*), on ne récupère que 79% de l'iode préalablement introduit. On n'obtient aucune amélioration si au liquide de l'allonge on ajoute différents agents réducteurs préconisés dans la littérature. L'addition d'eau oxygénée indiquée par *Moran* ne donne lieu à aucune amélioration du rendement mais elle empêche l'entraînement de substances inconnues susceptibles d'apporter une perturbation à la réaction catalytique de l'iode; en effectuant cette addition immédiatement après la réduction de l'acide iodique formé dans la solution obtenue après la calcination, on peut éviter en outre la présence de substances organiques de support dans le cas du dosage de l'iode dans des milieux fortement aqueux. La calcination en milieu acide de telles prises d'essais ne donne pas lieu à une perte d'iode comme le prétendent certains autres auteurs, même si la température atteint 250° C. La détermination de la correction d'essai à blanc nécessite l'addition d'eau oxygénée après la réduction ou de glycocolle avant la calcination; cette correction atteint environ 0,036 μg d'iode si l'on emploie des réactifs pour analyse soigneusement purifiés *(Merck)*. Les résultats obtenus confirment les «faibles» teneurs en iode du sérum (4 à 10 μg %) dont 3,5 à 8 μg % sont précipitables par l'acide trichloracétique en contradiction avec *Schittenhelm* et *Bauer*.

Si l'on tient compte de l'expérience ainsi acquise, l'utilité de la méthode est mise en évidence par son application pratique au dosage de l'iode minéral et de l'iode organique dans le sérum, au cours d'une cure thermale de 8 jours, par voie buccale, ainsi que par son utilisation dans une nouvelle technique rapide de dosage des iodures dans l'urine (réaction catalytique de l'iode effectuée directement sur l'urine diluée — utilisable pour des quantités d'iodures supérieures à environ 1 mg par urine de 24 heures).

Diskussion

H. *W. Ruzicza* (Wien): Aus der belgischen Literatur ist mir bekannt, daß kürzlich ein nicht toxisches Jodpräparat herausgebracht wurde, von dessen

Erscheinen ich Prof. *Lieb* berichtet habe. Ich weiß nicht, ob dieses Erzeugnis in seiner Wirkung auf die Schilddrüse schon geprüft wurde.

H. *H. Spitzy:* Der Mitteilung einer Tageszeitung konnte ich entnehmen, daß dieses Präparat — eine ungiftige Jodlösung — amerikanischer Provenienz ist. Durch die Redaktion erfuhr ich die Anschrift der erzeugenden Firma *(West Desinfecting Company, 42/16 West Long Island City, New York).* Leider war eine Bitte um Überlassung des Präparates für Untersuchungszwecke erfolglos.

H. *A. Dirscherl* (Darmstadt): Hoffentlich unterläuft mir kein Mißverständnis, aber ich nehme an, Sie finden jetzt nur ungefähr 70% vom vorhandenen Jod und arbeiten somit mit einem empirischen Faktor.

H. *H. Spitzy:* Wie ich in meinem Vortrag ausführen konnte, untersuchten wir mit der *Klein*schen Apparatur unter Heranziehung von ^{131}J die Jodausbeute bei der vom Autor vorgeschriebenen konstanten Destillationsdauer (15 Minuten) und variierten die Heizintensität. Wir destillieren, wie ich vielleicht zu schnell gesagt habe, bei unseren Bestimmungen 15 Minuten stets bei solcher Heizintensität, so daß Destillate von 18 bis 19 ml (bei *Klein* 10 bis 12 ml) resultieren, und vermehren auf Grund der gezeigten Ausbeutekurve (Abb. 1) die erhaltenen Werte um 10%.

H. *Th. Leipert* (Wien): Als wir vor 22 Jahren anfingen, uns mit dem Jod zu befassen, hatten wir natürlich ebenfalls am Anfang große Jodverluste. Es hat sich schließlich herausgestellt, daß wir ungefähr an die 90% Ausbeute herangekommen sind; die fehlenden 10% haben wir aus der Literatur übernommen und sie sind auch darin verblieben. Wo diese 10% wirklich stecken, haben wir nie genau gewußt. Sie haben nun sehr schön gezeigt — natürlich jetzt mit ganz anderen Methoden, als wir sie damals zur Verfügung hatten —, wie die Dinge wirklich liegen. Zur Erhöhung der Jodausbeute versuchten wir damals alle möglichen anorganischen Katalysatoren, u. a. auch eine Platinspirale, bis wir auf die Angabe mit dem Cer-IV-sulfat gestoßen sind. Ob dieses Cersalz wirklich katalytisch wirksam ist oder nicht, kann ich Ihnen heute nicht einmal sicher sagen. Jedenfalls haben wir beim Zusatz von Cer-IV-sulfat vor der Veraschung die höchsten Jodwerte gefunden; deshalb unsere Angabe, eine Messerspitze Cersulfat zuzusetzen. — Die Adsorption an Glas ist für uns sehr interessant. — Unter den verschiedenen Reduktionsmitteln, die wir verwendeten, war zunächst die Oxalsäure. Diese konnten wir in Lösungen nicht in der genügend hohen Konzentration bekommen. Schließlich verwendeten wir Eisen-II-sulfat, das sich als Reduktionsmittel bewährt hat. Doch bringt ein solches Salz immer Verunreinigungen in das System, weshalb wir es wieder fallen ließen und die Ameisensäure wählten. Wir gingen dabei von dem Gedanken aus, daß wir Kohlenoxyd bzw. Kohlendioxyd erhalten, also reine gasförmige Produkte. Auch mit diesem optimal sauberen Reduktionsmittel sind wir nie ganz an die obere Grenze herangekommen. Wir haben allerdings bei organischen Substanzen, wie Thyroxin, Dijodtyrosin usw., ebenfalls die 90%ige Ausbeute immer erreicht. Sie werden mir gerne zugeben, daß damals im ersten Jahrzehnt der Mikroanalyse ein Mikrogramm Jod zu bestimmen eine große Spielerei war. Wir waren damals glücklich, mit einem Minimum an Leerwerten diese Mengen gefunden zu haben. In der Folge wurde an der Methodik viel herumgearbeitet; ich selbst habe mich nicht mehr zu Wort gemeldet, da ich mir meiner Sache zu sicher war. Ich darf an den ersten Vortragenden *(Hänni)* erinnern, der gesagt hat, es ist viel modifiziert worden, so daß man den Apparat und die Methodik kaum mehr erkennt. Das ist richtig.

Darf ich auf den ersten Vortrag *(Hänni)* nochmals zurückkommen. Wenn wir damals Mitte der Dreißigerjahre in Nickel- oder Eisentiegeln wieder angefangen hätten, wären andere Autoren über uns hergefallen, denn das Veraschen im Tiegel war verpönt. Man verliert natürlich bei einer solchen Veraschung, wenn man sie nicht kann; *Fellenberg* konnte es. Aber viele andere können es nicht — und man verliert dann eben Jod. Man braucht ja nur an das Eindampfen eines *Fellenberg*schen Alkoholextraktes im Platintiegel zu denken, dem man ein paar Tropfen Lauge zugegeben hat. Selbst bei Eindampfen und vorsichtiger Vernichtung der restlichen organischen Substanz bei erhöhter Temperatur (ohne Aufglühen des Tiegels) kann man bei bekannten zugesetzten Jodmengen feststellen, daß Jod verlorengeht. Dies kann man durch einen gehörigen Überschuß von Lauge weitgehend verhindern, von dem allerdings andere, mit dem Sachgebiet Vertraute sagen, daß dadurch ein zu großer Salzfehler bei der Jodbestimmung selbst erhalten wird. Hätten wir seinerzeit im Nickeltiegel verascht, so hätten zahlreiche Jodanalytiker darin einen Fehler gesehen. Ich bin daher auch heute noch der Meinung, daß hier eine Schwäche des genannten Verfahrens liegt und daß man doch — wenn man schon verkohlt — in ein geschlossenes System gehen soll. Da ist zunächst das *McClendon*sche Verfahren, bei dem die Rauch- und Flugasche im elektrischen Feld eines *Cottrell*-Rohres niedergeschlagen wird. Ich halte davon sehr viel, obwohl ich nicht damit gearbeitet habe. Man kann mit dem Sauerstoffschwall in höheren Dosen arbeiten, als es bei der *Schwaibold*schen Apparatur möglich ist. Diese entspricht ja eigentlich nur dem alten Dennstedt-Rohr mit den entsprechenden Einsätzen. Gibt man hier keinen Überschuß an Sauerstoff, so gelingt die Bestimmung nicht. Hier hat der Holländer *Reith* angesetzt, der ein ziemlich weites Rohr verwendet und große Mengen organischer Substanz verbrennt. Allerdings hat er ein Rohrende offen und führt mit einem Tonrohr, der sogenannten *Gouda*-Tonpfeife, Sauerstoff direkt auf die Substanz. Aus dem Gesagten geht hervor, daß vor allem ein großer Überschuß an Sauerstoff vorhanden sein muß. Wenn ich noch einmal im Tiegel veraschen würde und eine Alkalischicht über die zu veraschende Substanz zu legen vergessen würde — also nicht nur mit Alkali mischen und dann langsam ankohlend erhitzen — so glaube ich sicher, daß es zu Jodverlusten käme. Dies ist wohl auch immer wieder bestätigt worden.

H. *K. Bürger* (Gendorf): Eine Bemerkung zur Frage der verlustlosen Veraschung von jodhaltigem, biologischem Material: In den vergangenen Kriegsjahren war ich im Zusammenhang mit Arbeiten über Proteine und deren Inhaltsstoffe gezwungen, auch Spuren von Jod zu bestimmen. Wir konnten damals feststellen, daß trockenes Milchalbumin — im Krieg stand ja nur Magermilch zur Verfügung — elementares Jod unter Bildung einer farblosen Verbindung offensichtlich adsorbiert. Denn dieses Jod ist durch Zusatz von Kaliumjodat und Wasser quantitativ wiederzufinden. Sie können diesen Versuch jederzeit nachprüfen. Auf dieser Beobachtung aufbauend veraschten wir trocken in einem Kolben und leiteten die entstandenen Dämpfe im Sauerstoffstrom in eine dem Kolben durch Schliff verbundene, mit Milchalbumin beschickte Säule. Auf diese Weise bestimmten wir das Jod. Die genannte Eiweißjodverbindung hat uns dann nicht weiter interessiert. Das Jod muß in ihr sehr locker gebunden sein, gleich einer Adsorptivbindung, denn wir konnten es quantitativ wiederfinden. Weitere Versuche galten der Verwendung von Calciumoxyd bei trockener Veraschung im Sauerstoffstrom — also die alte *Liebig*sche Halogenbestimmung. Hier ist interessant, daß

Calciumjodid im Gegensatz zu Calciumchlorid und -bromid thermisch spaltbar ist. Vielleicht ergäbe sich hier bei genauer Nachprüfung ein Weg, Jod im Mikromaßstab auf einfache Weise zu bestimmen, vor allem in Gegenwart großer Mengen von Chlorid bzw. Bromid. Ich mußte mich in der Folge von der Aufgabe der Jodbestimmung in biologischem Material leider zugunsten anderer Probleme entfernen, meine aber, daß mein Hinweis, auf diese alte *Liebig*sche Methode zurückzugreifen, vielleicht von Wert sein könnte.

H. *H. Hänni* (Liebefeld): Prof. *Leipert* äußerte Bedenken gegen die Rückkehr zur Nickelschale. Ich muß gestehen, daß auch mir dieser Schritt nicht sehr angenehm war. Wir vermischen die Substanz unter Zusatz einer bestimmten Menge von Wasser mit Kalium- oder Natriumcarbonat derart, daß ein dicker, homogen-alkalischer Brei entsteht. Auf diese Weise gelang es uns, den Verkohlungsvorgang bei niederen Temperaturen erträglich zu gestalten.

H. *H. Spitzy:* Zur Bemerkung von Prof. *Leipert* und der in der Literatur auch heute noch offenen Frage, ob das Cer-IV-sulfat als Katalysator bei der Veraschung einen Einfluß besitzt oder nicht, glaube ich auf Grund unserer zahlreichen Parallelversuche sagen zu können, daß sein Zusatz ohne Belang ist. Wir konnten jedenfalls keinen diesbezüglichen Unterschied in den Jodausbeuten im Destillat feststellen. Der Zusatz dieses anorganischen Katalysators wird aber dennoch bei allen in der Literatur auffindbaren naßsauren Veraschungsverfahren vorgeschrieben. Ameisensäure als Reduktionsmittel haben wir nicht versucht. Die von Herrn *Bürger* angeschnittene Jodalbuminbindung beschäftigt uns seit einiger Zeit. Auch wir konnten eigenartige Phänomene z. B. im menschlichen Serum feststellen. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die Ergebnisse bislang schwer reproduzierbar und z. T. widersprechend, so daß ich nicht mehr sagen kann. Wir hoffen, in absehbarer Zeit mit Hilfe von ^{131}J einiges zur Klärung beitragen zu können. Für den Hinweis, die *Liebig*sche Methode wieder einmal zu versuchen, danke ich sehr.

Nun einige Bemerkungen und Fragen an Herrn *Hänni* zu seinem Verfahren: Zunächst unterscheiden sich die beiden hier vorgetragenen Methoden nach Aufgabe und Leistung. Herr *Hänni* ist in der Lage, maximal noch 10^{-7} g Jod zu bestimmen, für seine Zwecke — Bestimmung des Jodgehaltes in Milch und Milchprodukten — durchaus ausreichend. Unser vorgeschlagenes Verfahren hingegen erlaubt noch die Bestimmung von 10^{-9} g Jod, also zwei Zehnerpotenzen weniger durch Heranziehung der außerordentlich leistungsfähigen katalytischen Jodreaktion. Herr *Hänni* benötigt bei seinem Verfahren zwei Veraschungen und auch zwei Destillationen. Wir glauben mit einer Veraschung und einer Destillation das Auslangen zu finden. Die von Herrn *Hänni* an Jodausbeuten im Destillat beobachtete unterschiedliche Reduktionswirkung von arseniger und phosphoriger Säure gegenüber Jodsäure — im ersteren Fall zu Jodwasserstoff, im zweiten Fall überwiegend zum allerdings nicht ausgesprochenen elementaren Jod — können wir nicht bestätigen. Wir erhielten durch ^{131}J-Messungen, damit gegen chemische Störungen immun, den eindeutigen Beweis, daß bei beiden Reduktionsmitteln gleiche Jodausbeuten im Destillat erhalten werden.

Herr *Hänni* berichtet, daß er mit der Abwandlung des *Leipert*schen Verfahrens nach *Zacherl* und *Stöckl* in Milchprodukten zu niedere Jodwerte gefunden habe. Bei bekannten Mengen Jodid, die nach der angegebenen Vorschrift behandelt wurden, ließ sich oft sogar nur die Hälfte wiederfinden. Herr *Hänni* wählte dann die Veraschung mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung und reduzierte nun mit phosphoriger Säure. Hier fand er bekannte Jodidmengen quantitativ wieder. Meine Frage: Wurde versucht

beim *Zacherl-Stöckl*schen Verfahren phosphorige Säure als Reduktionsmittel zu verwenden und ließen sich dann bessere Ergebnisse erzielen?

Schließlich entnehme ich aus Ihrem Vortrag, daß der Zusatz von 1 ml 6-n Schwefelsäure vor der zweiten Destillation genau abgemessen werden muß. Hier handelt es sich doch nur um das Einstellen des zum Ablauf der *Dushmann*-Reaktion nötigen p_H-Wertes. Ferner finden Sie, daß eine rasche zweite Destillation bei Ihrer Methode richtige Werte, hingegen eine verlängerte Destillation eigenartigerweise zu geringe Jodwerte liefert. Wäre es nicht denkbar, daß Jodverluste in der Vorlage entstehen können? Diese enthält in Ihrem Fall ja nur Wasser und damit zunächst J_2, so daß vielleicht die Kühlkapazität bei größeren Destillaten ein Abdampfen von Jod nicht hintanhalten würde. Mit ^{131}J könnte auch diese Frage einfach geklärt werden.

H. *H. Hänni:* Zur ersten Frage, die den Unterschied zwischen arseniger und phosphoriger Säure betrifft: Wir sind von der arsenigen zur phosphorigen Säure in der Meinung übergegangen, daß sich dadurch die Jodausbeute bei der Destillation verbessern ließe. Es hat sich aber nachträglich gezeigt, daß auch das Destillationsvolumen die Hauptursache war für die Verschiedenheit der erhaltenen Jodwerte. Ich will also nicht behaupten, daß arsenige Säure irgend eine andere Wirkung als phosphorige Säure hätte. Ich glaube, daß diese beiden in der Reduktionswirkung, wie Sie sagen, ähnlich sind.

H. *H. Spitzy:* Sie führten aus, daß die vollständige Zerstörung der organischen Substanz in Milch und Milchprodukten mit dem Chromsäure-Schwefelsäure-Gemisch leicht gelingt. Die Unterwerte an Jod bei Reduktion mit arseniger Säure veranlaßten Sie dann, die Veraschung mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung zu verwenden, der sie — da hiebei Fettstoffe nicht aufgeschlossen werden — einen alkalischen Voraufschluß bei mäßigen Temperaturen vorausschicken. Da Sie bei Ihrem kombinierten Aufschluß mit phosphoriger Säure zur Reduktion richtige Werte bekommen, müßte es doch genügen, dieses Reduktionsmittel auch beim *Leipert*schen bzw. *Zacherl-Stöckl*schen Verfahren zu verwenden, um zu richtigen Jodwerten zu gelangen.

H. *H. Hänni:* Ja, das stimmt. Nur müssen zur Gewinnung einer genügend großen Jodmenge für den späteren Nachweis verhältnismäßig große Mengen von Milchprodukten aufgeschlossen werden. Dies bedingt beim *Leipert*schen Verfahren große Mengen an Chromsäure und Schwefelsäure, so daß große Kolben nötig werden. Dadurch ergeben sich Nachteile für die folgende Destillation, da sehr große Volumina abdestilliert werden müssen. Aus diesem Grunde haben wir die alkalische Vorbehandlung beibehalten.

Die Säurekonzentration vor der zweiten Destillation — das ist ein Phänomen, das wir noch nicht aufklären konnten. Es hat sich bei Schwefelsäurezusätzen über das angegebene Maß hinaus gezeigt, daß eigenartigerweise zu viel Jod übertritt. Wahrscheinlich trägt hierfür das zugesetzte Kaliumjodid, das einer Nebenreaktion unterliegt, die Schuld.

H. *H. Spitzy:* Offensichtlich ist hier das für die Oxydation zur Jodsäure benötigte Brom nicht ganz entfernt. Dies läßt sich leicht umgehen, wenn man Ameisensäure zur Entfernung des Broms zusetzt und danach kurz aufkocht.

H. *H. Hänni:* Die Destillationsgeschwindigkeit spielt auch nach meinen Beobachtungen eine sehr eigenartige Rolle. Destilliert man langsam, so kann man schon mit freiem Auge bei großen Mengen eine Entfärbung beobachten, ehe noch alles Jod überdestilliert ist. Dies muß eine Nebenreaktion schon im Destillationskolben sein; die gleiche Erscheinung fanden wir auch bei

Reduktion mit Ameisensäure, bei der es uns nie gelang, die gesamte Jodmenge überzudestillieren.

H. *H. Spitzy:* Ähnliche Feststellungen konnten auch wir in Modellversuchen, allerdings nur bei Mengen von 10 bis 20 μg Jod und darüber treffen. Bei den von uns in der Praxis zu bestimmenden Mengen in der Größenordnung von Hundertstel Mikrogramm wäre dies ausgeschlossen.

Zusammenfassend muß dazu gesagt werden, daß trotz des Bemühens zahlreicher Autoren sowohl der Reaktionsablauf bei Verwendung verschiedener Reduktionsmittel wohl infolge der Vielzahl der Fremdionen und der herrschenden Temperatur, als auch die Natur des überdestillierten Jods (elementares Jod bzw. Jodwasserstoff) noch nicht eindeutig geklärt sind.

Literatur

[1] *Th. v. Fellenberg*, Ergebn. Physiol. **25**, 176 (1926).
[2] *S. B. Barker* und *M. J. Humphrey*, J. Clin. Endocrinology **10**, 1136 (1950); J. Clin. Investigation **30**, 55 (1951).
[3] *H. Brown*, *A. M. Reingold* und *M. Samson*, J. Clin. Endocrinology **13**, 444 (1953).
[4] *W. N. Harsha*, Amer. J. Med. Sci. **221**, 626 (1951).
[5] *B. Zak*, *H. W. Willard*, *G. B. Myers* und *A. J. Boyle*, Analyt. Chemistry **24**, 1345 (1952).
[6] *L. W. O'Neal* und *E. S. Simms*, Amer. J. Clin. Pathol. **23**, 493 (1953).
[7] *E. B. Sandell* und *I. M. Kolthoff*, Mikrochim. Acta **1**, 9 (1937).
[8] *Th. Leipert*, Biochem. Z. **261**, 436 (1933); **270**, 448 (1934); **280**, 416 (1935).
[9] *A. Sturm*, *K. Plötner* und *K. Maass*, Biochem. Z. **280**, 396 (1935).
[10] *E. Klein*, Endocrinologie **27**, 22 (1950).
[11] *M. K. Zacherl* und *W. Stöckl*, Mikrochem. **38**, 278 (1951).
[12] *A. L. Chaney*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 179 (1940).
[13] *N. B. Talbot* et al., J. Biol. Chem. **153**, 479 (1944).
[14] *A. Taurog* und *I. L. Chaikoff*, J. Biol. Chem. **163**, 313 (1946).
[15] *S. B. Barker*, J. Biol. Chem. **173**, 715 (1948).
[16] *A. C. Connor* et al., Surgery **25**, 510 (1949).
[17] *J. W. Thomas* et al., Analyt. Chemistry **22**, 726 (1950).
[18] *B. K. Shahrokh* und *R. M. Chresbo*, Analyt. Chemistry **21**, 1003 (1949).
[19] *F. Lachiver* und *J. Leloup*, Bull. soc. chim. biol. **31**, 1128 (1949).
[20] *A. L. Chaney*, Analyt. Chemistry **22**, 939 (1950).
[21] *H. F. W. Kirkpatrick*, Analyst **78**, 348 (1953).
[22] *H. Sobel* und *S. Sapsin*, Analyt. Chemistry **24**, 1829 (1952).
[23] *G. H. Ellis* und *G. D. Duncan*, Analyt. Chemistry **25**, 1558 (1953).
[24] *C. Nieman* et al., Chemist-Analyst **42** (1953).
[25] *E. A. Carr* et al., Science **111**, 552 (1950).
[26] *W. T. Caraway*, J. Clin. Endocrinology **12**, 1215 (1952).
[27] *L. V. Middlesworth* et al., Federation Proc. **12**, 147 (1952).
[28] *J. J. Moran*, Analyt. Chemistry **24**, 378 (1952).
[29] *F. Nesh* und *W. C. Peacock*, Analyt. Chemistry **22**, 1573 (1950).
[30] *E. Klein*, Biochem. Z. **322**, 388 (1952); Röntgen- und Laboratoriumspraxis VI, H. 5, S. 120.
[31] *H. Spitzy*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 130.
[32] *Th. Leipert*, Mikrochim. Acta **3**, 73 (1938).
[33] *E. Klein*, Biochem. Z. **323**, 275 (1952).
[34] *A. Schittenhelm* und *J. Bauer*, Z. ges. exp. Med. **119**, 45 (1952).
[35] *E. Klein*, Biochem. Z. **326**, 9 (1954).

Aus dem Zentralen Medizinisch-chemischen Laboratorium in Zagreb

Die spektrometrische Bestimmung des Kupfers im Serum

Von

Ibrahim Ruždić und **Kata Blažević**

Mit 3 Abbildungen

(Eingelangt am 8. Juni 1955)

Verschiedene organische Verbindungen geben mit Kupfer gefärbte Komplexe, die von einzelnen Autoren (z. B. *Hoste*[8], *Gruzewska*[14], *Wenger*[18]) zur kolorimetrischen Bestimmung kleiner Mengen Kupfer benützt wurden. Von allen diesen organischen Reagenzien hat das diaethyldithiocarbaminsaure Natrium die verbreitetste Anwendung gefunden[7], was insbesondere für die Bestimmung des Kupfers in biologischem Material zutrifft. Dies hängt damit zusammen, daß Diaethyldithiocarbaminat wegen seiner großen Empfindlichkeit schon mit den minimalen Mengen Kupfer, die im normalen Blutserum vorhanden sind, eine sehr intensive Färbung gibt, die sich leicht für photometrische Messungen auswerten läßt. Die Intensität der so entwickelten Farbe ist direkt proportional der Menge des vorhandenen Kupfers.

Die Tatsache, daß Diaethyldithiocarbaminat nicht nur mit Kupfer, sondern auch mit einer ganzen Reihe anderer Kationen gefärbte Komplexe bildet, weiterhin die Tatsache, daß die Farbe des Kupferkomplexes nicht stabil ist und daß das Kupfer sich im Serum nicht im Ionenzustand, sondern fast vollständig in irgendeiner Form als Kupferproteid[6] gebunden findet, veranlaßte die Ausarbeitung einer großen Zahl mehr oder weniger erfolgreicher Vorschriften für die Untersuchung des Serums, deren Analysenresultate reproduzierbar sein sollen.

Von allen Metallen, die mit Diaethyldithiocarbaminat reagieren, findet sich im Serum außer Kupfer eigentlich nur das Eisen, das die Kupferbestimmung merklich stört. Nach den Erfahrungen der Mehrzahl der Autoren[2, 3, 5, 12] kann diese Störung durch Maskierung des Eisens mit Natriumpyrophosphat beseitigt werden. Da aber der Kupferkomplex des

Diäthyldithiocarbaminats in Wasser schwer löslich ist[15], kann es leicht zu dessen teilweiser Ausfällung aus wäßrigen Lösungen kommen, wodurch die Farbintensität der Komplexlösung geschwächt wird. Um dies zu vermeiden extrahieren manche Autoren[1, 13] den Komplex mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln, wie z. B. mit Aether, Chloroform, Isoamylalkohol, Tetrachlorkohlenstoff u. ä. Die Hauptbedingung zur Erreichung verläßlicher Resultate ist bei den Extraktionsmethoden die quantitative Überführung des gefärbten Komplexes aus der wäßrigen in die organische Phase. Diese Überführung des Komplexes in die organische Phase bildet aber auch die potentielle Quelle jener Fehler und Schwierigkeiten, die die einzelnen Verfahren unzuverlässig erscheinen lassen. Manche Autoren erzielen die quantitative Überführung des Komplexes in die organische Phase durch mehrmaliges Extrahieren unter besonderen Bedingungen[1, 13], während andere[9] dies durch einmalige Extraktion und Zusatz von Hydroxylamin erreichen. Wieder andere Autoren[15] belassen den Kupferkomplex in der wäßrigen Lösung, erhöhen seine Löslichkeit aber durch Zusatz genau bestimmter Mengen von Alkohol. Die Hauptschwierigkeit bei dieser Art der Bestimmung liegt darin, daß das Verhältnis zwischen der Menge des zugesetzten Alkohols und der Menge des in der Lösung vorhandenen Kupfers konstant sein muß. Widrigenfalls erhält man wesentlich zu niedrige Werte.

Die Meinungen über die Frage der Überführung des Serumkupfers in den Ionenzustand sind ebenfalls geteilt. Manche Autoren[11, 16] setzen das Kupfer des Serums durch Mineralisierung in Freiheit, während andere dies durch Hydrolyse mit Salzsäure[15] und Fällung der Eiweißstoffe mit Trichloressigsäure erreichen. *Cartwright*[3] vertritt die Meinung, daß das Kupfer auch ohne vorherige Behandlung des Serums mit Salzsäure in den Ionenzustand überführt werden kann, und zwar durch mehrmalige Bearbeitung des Serums mit heißer Trichloressigsäure. *Tompsett*[17] und andere[10] führen an, daß das Kupfer auch durch einfache Fällung der Eiweißstoffe durch kalte Trichloressigsäure quantitativ in das Filtrat übergeht. *Yoshikawa*[19] und Mitarbeiter haben aber durch Anwendung von radioaktivem Kupfer nachgewiesen, daß nur $^2/_3$ des Kupfers von den Eiweißstoffen abgetrennt werden, wenn das Serum mit kalter Trichloressigsäure behandelt wird.

Da die angeführten Verfahren zur Bestimmung des Kupfers im Serum mit Diäthyldithiocarbaminat entweder langwierig oder aber nicht genügend verläßlich sind, haben wir versucht, zur Bestimmung des Kupfers im Serum ein Verfahren auszuarbeiten, das einen Kupferkomplex mit Diäthyldithiocarbaminat mit unveränderter Farbintensität der Lösung, jedoch ohne Überführung des Komplexes in organische Lösungsmittel verwendet. Diese Stabilität der Farbe des Kupferkomplexes in wäßriger Lösung haben wir durch Zusatz von 0,05%iger wäßriger Lösung von

Pektin erreicht, das hier als Schutzkolloid wirkt. Durch den Pektinzusatz wird erreicht, daß die Farbintensität des Kupferkomplexes über einen Zeitraum von 12 Stunden unverändert bleibt, wodurch die genaue photometrische Messung der Farbintensität ermöglicht ist. Die Genauigkeit des Farbvergleiches wird durch dieses Verfahren in solchem Maße erhöht, daß die Gültigkeit des *Lambert-Beer*schen Gesetzes bestätigt werden konnte. Dies wurde für den Konzentrationsbereich von 0,5 bis 7 μg Kupfer in 15 ml Lösung festgestellt.

Experimenteller Teil

Reagenzien

1. Kupferfreies Wasser;
2. 20%ige Trichloressigsäurelösung;
3. gesättigte Lösung von analysenreinem Na-pyrophosphat;
4. in einer Glasapparatur wird analysenreines Ammoniak destilliert und in kupferfreiem Wasser bis zur Sättigung aufgefangen;
5. wäßrige Pektinlösung: 1 g Pektin wird angefeuchtet und mit 60 ml redest. Wasser von 50°C übergossen; dann wird bis zur völligen Auflösung gerührt und über Nacht stehengelassen. Danach wird das Ganze in einen 100-ml-Meßkolben übertragen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. 5 ml dieser Pektinstammlösung werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Das Pektin wurde aus Äpfeln gewonnen. Spez. Gew. 140,012; Äquiv. Gew. 704; Veresterungsgrad 73,54%; Reinheitsgrad 86,41%; Asche 0,23%; Wassergehalt 10,8% (*D. Sulc*, Instit. f. Ind. Forsch., Zagreb);
6. 0,2%ige Lösung von diäthyldithiocarbaminsaurem Na in kupferfreiem dest. Wasser;
7. Kupfer-Standardlösung: 0,3928 g krist. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ werden in 1 Liter kupferfreiem Wasser gelöst. Diese Lösung wird nach Bedarf verdünnt.

Apparatur

Extinktionsmessungen: Die Messungen wurden bei 440 mμ ausgeführt. Küvette 2,999 cm. Spektralphotometer Zeiss. Die Glasgeräte müssen aus Qualitätsglas sein (z. B. Jena, Wirag, Pyrex). Um Verunreinigung mit Kupfer zu verhindern, müssen alle Glasgeräte mit heißer 5-n HCl gewaschen und mit dest. Wasser ausgespült werden. Das Wasserbad muß aus Aluminium oder irgend einem anderen Metall sein, das kein Kupfer enthält, und wird mit destilliertem Wasser gefüllt.

Ausführung

2 ml Serum werden in einem Zentrifugenglas mit 6 ml Wasser vermischt und mit 2 ml 20%iger Trichloressigsäurelösung unter Umrühren

versetzt. Das Zentrifugenglas wird für 10 Minuten in ein Wasserbad von 90 bis 95°C gestellt und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur filtriert. Vom klaren Filtrat pipettiert man 5 ml in eine Eprouvette mit einer Marke bei 15 ml und versetzt mit 1 ml Na-pyrophosphatlösung, 2 ml Ammoniak, 1 ml 0,05%iger Pektinlösung, 1 ml 0,2%iger Na-Diäthyldithiocarbaminatlösung und füllt mit Wasser bis zur Marke. Nachdem der Inhalt gut durchgemischt wurde, wird die Extinktion gemessen.

Wenn nicht genügend Serum zur Verfügung steht, kann man nach folgendem Verfahren auch mit 1 ml Serum arbeiten. 1 ml Serum wird in einem Zentrifugenglas mit 1 ml Wasser vermischt und mit 2 ml 20%iger Trichloressigsäurelösung unter Umrühren versetzt. Das Zentrifugenglas wird für 10 Minuten in ein Wasserbad von 90° bis 95°C gestellt und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur 10 Minuten zentrifugiert. Die klare Lösung wird in ein Zentrifugenglas mit einer Marke bei 15 ml abpipettiert, während der Niederschlag zweimal mit je 2 ml 20%iger Trichloressigsäurelösung verrieben, und jedesmal im Wasserbad je 5 Minuten erwärmt und danach zentrifugiert wird. Die oben stehenden Flüssigkeitsschichten werden mit der Hauptmenge des Zentrifugenglasinhaltes vereinigt und 1 ml Na-pyrophosphatlösung, 2 ml Ammoniak, 1 ml 0,05%ige Pektinlösung, 1 ml 0,2%ige Na-diäthyldithiocarbaminatlösung dazugegeben und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Der Inhalt wird gut durchgemischt und die Extinktion gemessen.

Um die Verläßlichkeit unseres Verfahrens zu überprüfen, wurden zwei Reihen von Versuchen mit steigenden Konzentrationen ausgeführt. Die erste Reihe enthielt Standardlösungen von Kupfer in Wasser, die zweite im Serum. Auf diese Weise konnten wir feststellen, inwiefern die Genauigkeit dieser Methode durch Serumbestandteile beeinträchtigt wird.

Die Standardreihe umfaßte zehn verschiedene Konzentrationsbereiche zwischen 0,5 und 5 μg, die Serumreihe von 0 bis 4,5 μg. Mit jeder Konzentration der Standardreihe wurden je drei und mit der Serumreihe je vier Bestimmungen ausgeführt. Die Extinktionsmessungen wurden mit dem Zeiss-Opton Spektralphotometer unter den angegebenen Versuchsbedingungen gemessen. Die erhaltenen Werte wurden statistisch bearbeitet. Da die funktionellen Verhältnisse der verschiedenen Konzentrationen gegenüber den entsprechenden Extinktionen linear sind (*Beer*sches Gesetz), wurden auch unsere Ergebnisse mit linearen Gleichungen (Regressionen) dargestellt. Auch wurde die Verläßlichkeit dieser errechneten Geraden überprüft. Um die zufälligen Versuchsfehler festzustellen, benutzten wir folgenden mathematischen Ausdruck[4]:

$$f = \pm 3{,}0902 \frac{s^2}{b^2} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \left(\frac{\bar{Y} - \bar{y}}{b}\right)^2 \frac{1}{\Sigma (x - \bar{x})^2}}.$$

Hierin bedeuten f die Verläßlichkeitsfehlergrenzen bei 99,9%, s^2 die Vari-

ante, b die Richtungskoeffizienten der linearen Gleichung, m die Zahl der Parallelbestimmungen, n die Zahl der Extinktionswerte, Y den errechneten Extinktionswert, y die gemessenen Extinktionswerte, $\bar{y} = \frac{\Sigma y}{mn}$, x die aus dem gefundenen Extinktionswert errechnete Kupferkonzentration und $\bar{x} = \frac{\Sigma x}{mn}$. In der Standardreihe wurden 10 Extinktionswerte mit 30 Einzelbestimmungen, in der Serumreihe 10 Extinktionswerte mit 40 Einzelbestimmungen gemessen (Tabelle 1.).

Tabelle 1. Einzelbestimmungen von Kupfer und ihre Extinktionswerte im Wasser und Serum

Versuch Nr.	Kupfermenge in µg	Einzelvergleichswerte der Extinktionen						
		in Wasser			im Serum			
1	0,0	—	—	—	0,085	0,085	0,083	0,083
2	0,5	0,017	0,017	0,018	0,106	0,106	0,102	0,103
3	1,0	0,038	0,039	0,038	0,124	0,123	0,121	0,122
4	1,5	0,057	0,057	0,056	0,145	0,145	0,142	0,143
5	2,0	0,077	0,077	0,077	0,150	0,155	0,160	0,155
6	2,5	0,092	0,093	0,094	0,180	0,180	0,182	0,183
7	3,0	0,110	0,111	0,111	0,195	0,195	0,190	0,191
8	3,5	0,126	0,127	0,125	0,221	0,220	0,220	0,223
9	4,0	0,143	0,145	0,144	0,231	0,232	0,232	0,232
10	4,5	0,165	0,163	0,163	0,255	0,255	0,256	0,256
11	5,0	0,182	0,182	0,182	—	—	—	—

Um die Verläßlichkeit der Unterschiede zwischen den Richtungskoeffizienten der linearen Gleichungen der Standard- und Serumreihe festzustellen, das heißt ob die Reaktion vom Serum inhibiert wird, benutzten wir folgende Gleichung:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{s \sqrt{\frac{1}{\Sigma(x_1 - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\Sigma(x_2 - \bar{x}_2)^2}}}$$

Bestimmungen, die vom fünffachen Werte des wahrscheinlichen Fehlers einzelner Bestimmungen abweichen, wurden nicht in Betracht gezogen, da der systematische Fehler außerhalb der Zufälligkeitsgrenzen liegt.

Diskussion

Das beschriebene Verfahren zur Bestimmung des Kupfers im Serum ist einfach und rasch. Die Resultate, die nach diesem Verfahren erhalten werden, sind sehr gut reproduzierbar unter der Voraussetzung, daß die verwendeten Gefäße und Reagenzien der geforderten Reinheit entsprechen.

Die vorhergehende Hydrolyse des Serums mit Salzsäure, die manche Autoren als Vorbedingung für die quantitative Trennung des Kupfers von den Eiweißstoffen angeben, erübrigt sich. Wir haben festgestellt, daß dieselben Kupferwerte erhalten werden, gleichgültig ob man die Bestimmung mit 1 ml oder mit 2 ml Serum durchführt. Wenn genügend Serum vorhanden ist, arbeitet man besser mit 2 ml, weil das Verfahren dann kürzer ist und leichter durchgeführt werden kann. Wegen der günstigen Schutzwirkung des Pektins kommt es zu keiner Abschwächung der Farbe des Kupferkomplexes.

Durch die inhibierende Wirkung des Serums und durch die Eiweißfällung wurde die Farbintensität nur sehr wenig verändert (Tabelle 2).

Tabelle 2. Das Verhältnis bekannter Kupferkonzentrationen und ihrer Extinktions-Mittelwerte in 1 ml

Versuch Nr.	Kupfermenge in µg	Mittelwerte parallel gemessener Extinktionen		Theoretische Extinktionswerte		Unterschiede der theoretischen Extinktionswerte	Unterschiede der theoretischen Werte von den Extinktionen der Wasserreihe in %
		in Wasser	im Serum	in Wasser	im Serum		
1	0,0	—	0	—	0	—	—
2	0,5	0,017	0,020	0,020	0,018	0,002	10,0
3	1,0	0,038	0,039	0,038	0,037	0,001	2,6
4	1,5	0,057	0,061	0,056	0,054	0,002	3,6
5	2,0	0,077	0,071	0,074	0,075	— 0,001	— 1,4
6	2,5	0,093	0,097	0,092	0,094	— 0,002	— 2,2
7	3,0	0,111	0,110	0,110	0,112	— 0,002	— 1,8
8	3,5	0,126	0,137	0,128	0,131	— 0,003	— 2,3
9	4,0	0,144	0,148	0,146	0,150	— 0,004	— 2,7
10	4,5	0,164	0,171	0,164	0,169	— 0,005	— 3,1
11	5,0	0,182	—	0,182	0,188	— 0,006	— 3,3

Die Unterschiede finden sich in der dritten Dezimalstelle des durchschnittlichen Extinktionswertes; sie betragen meistens 1 bis 3% der Werte der Standardlösung. Für die Extinktionswerte der Standardlösung gilt folgende Gleichung:

$$y_1 = 0{,}0359\, x_1 + 0{,}0021$$

x_1 = Kupferkonzentrationen, y_1 — Extinktion. Der Wert 0,0021 in dieser Gleichung ist zufällig, da er sich innerhalb der Grenzen des zufälligen Fehlers befindet ($\pm$ 0,078 µg/1 ml). Deshalb stellt diese lineare Gleichung eine Gerade dar, die durch den Ausgangspunkt des Koordinatensystems geht (Abb. 1).

Die Extinktionswerte des Kupfers im Serum geben folgende lineare Gleichung:

$$Y_2 = 0{,}0376\, x_2 + 0{,}0846.$$

y_2 = Serumkupferkonzentration, x_2 = Extinktion. Die Konstante 0,0846 ist signifikant und stellt den Extinktionswert des nativen Kupfers im Serum dar; sie wird von den theoretischen, bzw. experimentell ermittelten

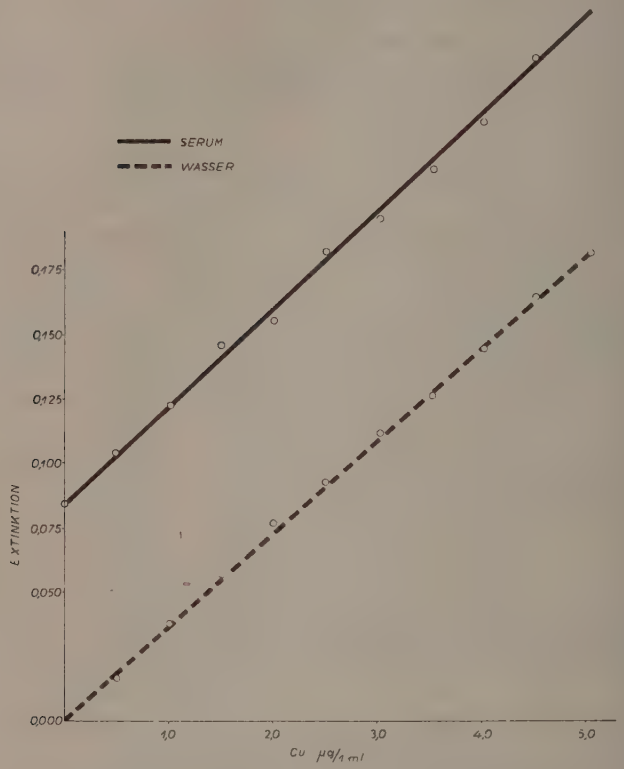


Abb. 1. Bekannte Kupferkonzentrationen und ihre Extinktions-Mittelwerte in 1 ml

Extinktionswerten abgezogen, um die Kupfermenge, die dem Serum zugesetzt wurde, zu erhalten (Tabelle 2).

Dieses Vorgehen scheint uns richtiger zu sein, als das Abziehen des experimentell ermittelten Wertes für das native Kupfer im Serum von den höheren Werten derselben Reihe, vor der Ausgleichungsrechnung der Extinktionswerte für die betreffende Gleichung. Der Unterschied zwischen den Richtungskoeffizienten beider Gleichungen ist signifikant, nach der Distribution von „Student" ($P = 0{,}009$), aber er ist sehr gering.

Die Verläßlichkeitsgrenzen nahmen wir mit 99,9% Wahrscheinlichkeit

(Tabelle 3), das heißt, daß von 1.000 ermittelten Extinktionswerten nur einer sie überschreiten kann.

Tabelle 3. Die Verläßlichkeitsgrenzen der Extinktionswerte im Wasser und Serum pro ml
(bei 99,9%; 3,0902mal mittlerer Fehler)

Versuch Nr.	Kupfermenge in µg	Die Verläßlichkeitsfehlergrenze bei der Wahrscheinlichkeit 99,9 % in µg Cu	
		in Wasser	im Serum
1	0,0	0,0782	0,0179
2	0,5	0,0763	0,0173
3	1,0	0,0739	0,0170
4	1,5	0,0720	0,0167
5	2,0	0,0705	0,0164
6	2,5	0,0698	0,0164
7	3,0	0,0698	0,0167
8	3,5	0,0705	0,0170
9	4,0	0,0720	0,0173
10	4,5	0,0739	0,0179
11	5,0	0,0763	0,0185

Diese Verläßlichkeitsgrenzen sind für mittlere Kupferkonzentrationen im Wasser $\pm$ 0,0698 bis $\pm$ 0,0782 µg/ml; im Serum $\pm$ 0,0164 bis $\pm$ 0,0179 µg/ml; die kleinsten Werte liegen für beide Konzentrationsreihen bei 2,5 µg/ml (Abb. 2).

Diese Fehler ausgedrückt in Prozenten der betreffenden Konzentrationen betragen meistens 1 bis 4% und sind niedriger bei der Serumreihe (Abb. 3). Daraus geht hervor, daß diese Arbeitsmethode mit großer Genauigkeit für Kupferbestimmungen im Serum anwendbar ist.

Herrn Dr. *M. Bajzer* vom Zentralen Hygieneinstitut in Zagreb danken wir für die statistische Bearbeitung der Untersuchungen auch an dieser Stelle bestens.

Zusammenfassung

Das Pektin ist als Schutzkolloid zur Stabilisierung der Farbe des Kupferkomplexes ausgezeichnet anwendbar. Die Fehlergrenzen bei der Bestimmung des Kupfers in wäßerigen und in Serum-Lösungen sind gering. Die Unterschiede zwischen den ermittelten Extinktionswerten in wäßerigen und Serum-Lösungen sind zwar signifikant, aber doch so gering, daß sie vernachlässigt werden können.

Das beschriebene Verfahren ist empfindlich, einfach und auch serienweise leicht mit großer Genauigkeit ausführbar.

Summary

Pectin can be used to good advantage as a protective colloid for stabilizing the color of the copper complex. The limits of error are small in the determination of copper in aqueous and serum solutions. The differences between the observed extinction values in aqueous and serum solution are admittedly significant but they are so slight that they may be neglected.

The procedure described here is sensitive, simple, and it may easily be conducted with high accuracy with a series of samples.

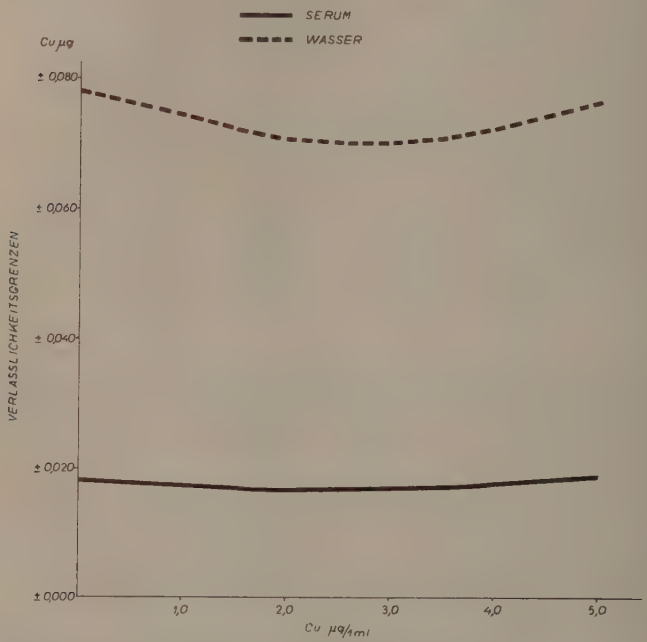


Abb. 2. Verläßlichkeitsgrenzen erhaltener Extinktionswerte in 1 ml

Résumé

La pectine est un excellent colloïde protecteur pour la stabilisation de la couleur du complexe du cuivre. Dans des solutions aqueuses ou dans le sérum des limites d'erreur du dosage du cuivre sont très faibles. Les différences qui existent entre les valeurs déterminées par extinction en solutions aqueuses ou dans le sérum sont à peine significatives; de toutes façons elles sont si faibles qu'elles peuvent être négligées. La technique décrite est sensible, simple et aisément utilisable dans les dosages de séries avec grande précision.

Diskussion

H. *J. B. Gillis:* Je voudrais demander à M. *Ruždić* s'il a connaissance de la méthode de dosage de cuivre dans le serum à l'aide du dipyridyle, une

méthode, que nous avons employée et mise au point en notre laboratoire et qui a l'avantage sur la méthode à la diéthyl carbamide de n'être pas influencée par le fer. Ce réactif, étudié plus particulièrement par *J. Hoste*, est tout à fait spécifique du cuivre.

H. *I. Ružić:* Ich kenne zwar diese Methode, hatte aber noch keine Gelegenheit mit diesem Reagens zu arbeiten, da es mir bisher nicht zugänglich war.

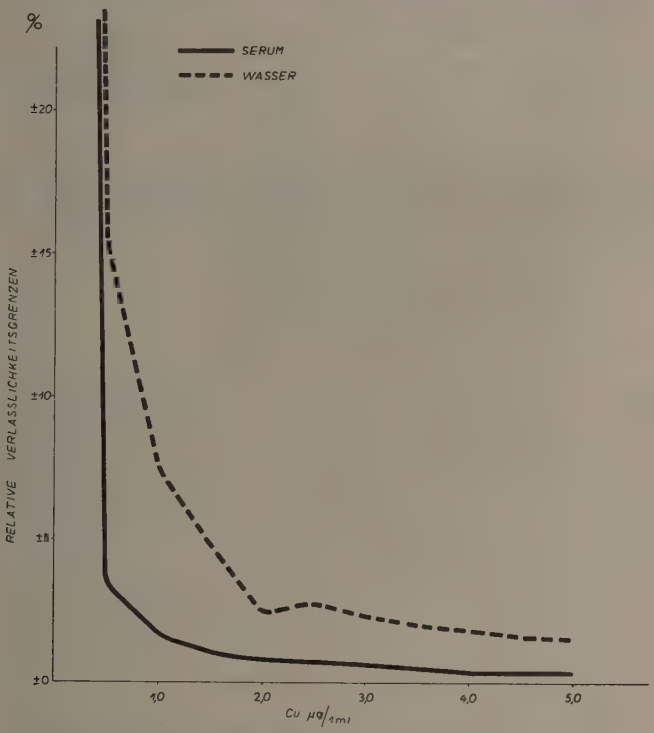


Abb. 3. Relative Verläßlichkeitsgrenzen erhaltener Extinktionswerte in 1 ml

H. *J. B. Gillis:* Je voudrais vous demander si l'influence du fer a été étudié par vous d'une façon complète, c'est à dire je constate que vous avez traité le sang en présence d'une teneur en fer minima et je vous demande si l'influence d'une teneur en fer variable a été étudiée également.

H. *I. Ružić:* Ich habe diesen Einfluß untersucht und hatte auch nach Zusatz von Eisen keine Schwierigkeiten, jedenfalls nicht im Konzentrationsbereich von 100 bis 500 µg Cu/100 ml.

Literatur

[1] *I. Abelin*, Spezielle klinische chemische Methoden. Bern: Huber. 1952.
[2] *L. Braun* und *L. Schaffer*, Biochem. Z. **304**, 397 (1940).

[3] *C. E. Cartwright, P. J. Jones* und *M. M. Wintrobe*, J. Biol. Chem. **160**, 593 (1945).
[4] *O. L. Davies*, Statistical Methods in Research and Production. London: 1945.
[5] *A. Eden* und *H. M. Green*, Biochemic. J. **34**, 1202 (1940).
[6] *B. Eisler, K. G. Rosdahl* und *H. Theorell*, Biochem. Z. **286**, 435 (1936).
[7] *K. Hinsberg* und *K. Lang*, Medizinische Chemie. 2. Aufl. München: Urban u. Schwarzenberg. 1951. S. 25.
[8] *J. Hoste, A. Heiremans* und *J. Gillis*, Mikrochem. **36/37**, 349 (1951).
[9] *Kerijiro Kimura* und *Jerkio Murakami*, Mikrochem. **36/37**, 958 (1951).
[10] *A. Locke, E. R. Mein* und *D. O. Rosbach*, J. Clin. Investigation **11**, 527 (1937).
[11] *W. D. McFarlane*, Biochemic. J. **26**, 1022 (1932).
[12] *R. H. Müller* und *A. T. Burtsell*, Mikrochem. **28**, 209 (1939).
[13] *J. C. Robinson*, J. Biol. Chem. **179**, 1103 (1949).
[14] *G. Roussel* und *Z. Gruzewska*, Bull. soc. chim. biol. **20**, 365 (1938).
[15] *H. G. Schmidt*, Biochem. Z. **302**, 256 (1939).
[16] *J. Schweibold* und *A. Lesmüller*, Biochem. Z. **301**, 331 (1939).
[17] *S. L. Tompsett*, Biochemic. J. **28**, 1544 (1934).
[18] *P. E. Wenger*, Mikrochem. **29**, 210 (1941).
[19] *H. Yoshikawa, P. F. Hahn* und *W. F. Bale*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **49**, 285 (1942).

Philips Forschungslaboratorium N. V. Philips' Gloeilampenfabrieken,
Eindhoven - Niederlande

Bestimmung von Spurenelementen (ohne chemische Vorbehandlung) und Analyse kleinster Materialmengen mittels spektrochemischer Methoden

Von

N. W. H. Addink

(Eingelangt am 17. März 1955)

Wenn man spektrochemisch analysiert, eignet sich der Gleichstrombogen am besten, Spuren von Elementen zu erfassen. Eine bestimmte Menge des vorliegenden Materials (5 oder 10 mg, bzw. 0,1 ml) wird auf die Anode gebracht und verdampft. Während der Verdampfung werden die Atome thermisch bei einer Temperatur von 4000 bis 7000° K angeregt und senden charakteristisches Licht aus, das spektral zerlegt wird. Jedes Atom zeigt seine spezifischen Wellenlängen und die Intensität jeder Wellenlänge ist ein Maßstab für die Konzentration des betreffenden Elementes nach der Gleichung (1):

$$\text{Intensität} \sim \frac{n_a}{n_g} \sim e^{-E/kT} \qquad (1)$$

(n = Anzahl Atome in angeregtem Zustand (n_a)
und im Grundzustand (n_g);
E = Anregungsenergie;
T = absolute Temperatur;
k = Boltzmannsche Konstante.)

Unter bestimmten, konstant gehaltenen Bedingungen kann man entweder das Licht der Säule des Bogens (Methode A) oder das von Stellen des Bogens ausgesandte Licht zur Analyse nehmen, an denen die Temperatur höher ist als in der Mitte: das sogenannte Anoden- und Kathodenlicht (Methode B). Im letzten Fall findet man nach der Gleichung (1) höhere Intensitäten und deswegen wird die untere Grenze der Nachweisbarkeit erniedrigt. Diese wird mit Q_e, jene mit K_e bezeichnet.

Schließlich kann man durch Änderung der Bogenatmosphäre die Temperatur weiter steigern beziehungsweise die Verweilzeit der Atome im Bogen verlängern. Dementsprechend wird die Nachweisbarkeitsgrenze herabgesetzt. Dies gilt insbesondere für Elemente, deren Anregungsenergie groß ist (siehe Gleichung 1).

Tabelle 1. Erfassungsgrenzen in μg

Element Wellenlänge in Å	Methode A (K_e)	Methode B (Q_e)	Chemisch-analytisch	
Ag 3280	0,06	0,01	0,4	Dithizon
Al 3082	0,6	0,1	0,5	8-Hydroxychinolin(CCl_3H)
As 2780	15	0,6	0,25	Molybdänblau
B 2498	0,3	~ 0,07	0,01	Curcumin
Be 3130	~ 0,3	0,02	0,03	Acetylaceton (CCl_3H)
Bi 3067	~ 0,35	0,06		
Cd 3261	5	0,3		
Co 3453		0,04	0,35	β-Nitroso α-naphthol
Cr 2849		0,1	0,15	Diphenylcarbazid
Cu 3247	0,03	0,01	0,4	Diäthyldithiocarbamat (CCl_4)
Fe 3020	0,5	0,05	0,5	o-Phenanthrolin
Ga 2943	0,25	0,07		
Ge 3039		0,1		
Hg 2536		~ 0,3		
In 3256	~1,5	~ 0,2		
K 3446	~ 125	~ 10		
La 3337	4	~ 0,4		
Li 3232	10	~ 0,4		
Mg 2852	0,03	0,005	1,0	8-Hydroxychinolin–$FeCl_3$
Mn 2798	0,08	0,02	~ 0,01	4-4[1] Tetramethyldiaminotriphenylmethan
Mo 3132	3	0,3	3,0	KCNS + $SnCl_2$
Na 3302	20	~ 3		
Nb 3195	~ 5	~ 2		
Ni 3414	0,1	0,03	0,4	Dimethylglyoxim + NaOH
P 2535	10	0,2	0,3	Molybdat + Hydrazinsulfat
Pb 2833	2	0,15	0,3	Dithizon
Pt 3064		~ 0,1		
Sb 2598	2	0,2		
Si 2516	0,3	0,08	0,12	Molybdänblau
Sn 2840	0,5	0,1		
Ti 3242	0,8	~ 0,25	0,3	Tiron
Tl 2767		~ 0,5		
V 3185	0,7	~ 0,1	20	H_2O_2
Zn 3345	6	0,6	0,2	Dithizon
Zr 3438	~ 2		1,5	Alizarinsulfosäure

Die Tabelle 1 zeigt mehrere Zahlen der spektrochemischen Erfassungs-

grenzen im Vergleich mit analytisch-chemischen Werten. Die letzteren verdanke ich Dr. *A. Claassen* vom hiesigen Laboratorium. Die chemischen Erfassungsgrenzen (in μg) sind mittels eines Unicam-Spektrophotometers (gewählte Grenze: Extinktion 0,04 [= 92% Transmission] für 10 ml einer Lösung mit 4 cm Schichtdicke) bestimmt worden.

Es wird den Spektrochemiker interessieren, inwieweit K_e und Q_e voneinander abhängen. Für Elemente mit einer Ionisierungsspannung $E_i \geqq 7\ eV$ hat sich experimentell folgende Beziehung ergeben:

$$\log \frac{K_e}{Q_e} = 0{,}24\, E_i - 0{,}64 \tag{2}$$

Theoretisch kann man die folgende Formel (3) aus Formel (1) ableiten, indem man die Intensität umgekehrt proportional K_e beziehungsweise Q_e setzt:

$$\log \frac{K_e}{Q_e} = 0{,}51 \times 10^4 \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) E_i \tag{3}$$

Setzt man die Faktoren von E_i in den Formeln (2) und (3) einander gleich, so zeigt es sich, daß bei einer Temperatur der Bogensäule von z. B. 4500° K eine mittlere Temperatur der Elektrodenschichten gleich 5700° K gefunden wird.

Bei der Methode B beeinflußt der Hauptbestandteil der zu untersuchenden Probe im Gegensatz zur Methode A die Temperatur des Bogens; infolgedessen ist die Genauigkeit herabgesetzt. Um genauere Werte zu erhalten, lohnt es sich, nach dem Additionsverfahren zu arbeiten. Es hat sich gezeigt, daß dann die Differenz mit dem arithmetischen Mittel einer Anzahl genauer chemischer bzw. spektrochemischer Bestimmungen etwa 14 bis 20% relativ betragen kann.

Man kann nun die Standardabweichung weiter um einen Faktor $\sqrt{n}$ herabsetzen, indem man das n der Messungen erhöht. In dieser Weise ist es uns gelungen, z. B. Zink mit einer Standardabweichung von 5% rel. in Blut zu bestimmen (der mittlere Zinkgehalt des menschlichen Blutes beträgt 0,0006[5]%).

Die Analyse von Lösungen kann man in derselben Weise ausführen, indem man eine geringe Menge (z. B. 0,1 ml) auf speziell präparierten Graphitelektroden bis zur Trockne verdampft (siehe Tabelle 2).

Eine schon oben erwähnte Möglichkeit zur Erweiterung der Nachweisbarkeitsgrenze besteht darin, daß man die Anregung der Atome im Bogen in stärkerem Maße zustande bringt. In einer Argonatmosphäre wurde so bei Elementen mit höherer Ionisierungsspannung ($\geqq 9\ eV$) ein Faktor 10 gewonnen. Diese Untersuchungen sind noch im Gange.

Tabelle 2

Element	Lösung	Spektrochemisch mg/ml	Chemisch mg/ml
Fe	A. C. T. H. Lösung	0,04	0,03
Cu	A. C. T. H. Lösung	$0{,}02^5$	0,02
Fe	^{131}J-Lösung + KJ	0,002	0,001
Sn	Wässerige Lösung + KJ	0,02	0,025
Ni	Wässerige Lösung + KJ	0,008	0,010

Tabelle 3. Gläser.

Probemenge:	0,2 mg	Probemenge:	0,2 mg
Elektrodendurchmesser:	10 mm	Elektrodendurchmesser:	8 mm
Stromstärke:	10 Amp.	Stromstärke:	7 Amp.
Aufnahme:	in triplo	Aufnahme:	in triplo
Brennzeit:	1 ($1^1/_2$) Minuten	Brennzeit:	1 Minute

	Spektrochemisch mg/ml	Chemisch mg/ml		Spektrochemisch mg/ml	Chemisch mg/ml
1.			1.		
$BaCO_3$	44	40,9	SiO_2	79	80,6
$SrCO_3$	32	33,7	B_2O_3	15	12,8
$CaCO_3$	24	25,3	Na_2O	4,5	4,16
			Al_2O_3	1	1,9
2.			2.		
Bi	53	53,5	SiO_2	43	50,3
Sn	27	26,0	PbO	37	33,6
Cd	20	20,5	Na_2O	8,5	5,5
			Al_2O_3	0,5	0,3
3.			3.		
Ti	59	62	SiO_2	75	74,1
Al	29	28	Na_2O	13	16,6
Cr	1,5	0,83	CaO	7	4,7
Fe	1	0,8	MgO	3	3,2
Nb	0,6	0,6			
V	0,8	0,5			
Zr	0,3	0,4			

Es ist selbstverständlich, daß man, wenn äußerst geringe Materialmengen vorliegen, mittels spektrochemischer Methoden doch ziemlich genau die Bestandteile bestimmen kann. Es brauchen nur die Hauptlinien der Elemente gemessen zu werden. Die benötigte Menge kann man theoretisch

der Tabelle 1 entnehmen; man braucht nur Bruchteile eines Milligramm, in der Praxis 0,1 bis 0,01 mg. Um Glimmschichtbildung vorzubeugen, kann man etwas größere Mengen zur Verdampfung und Anregung bringen. Die Tabelle 3 zeigt einige Ergebnisse, wobei von 0,2 mg Probe ausgegangen wurde.

Zusammenfassung

Die mikrochemischen und spektrochemischen Erfassungsgrenzen von mehreren Spurenelementen werden angegeben. Es besteht ein Zusammenhang zwischen den bei verschiedenen Temperaturen spektrochemisch bestimmten unteren Grenzen der Nachweisbarkeit. Schließlich werden einige Daten hinsichtlich der minimalen Quantität der Probe angeführt.

Summary

The limits of identification of serveral trace elements are given for microchemical and spectrochemical determinations. There is a relationship between the lowest limits of detection as determined by spectrochemical procedures at various temperatures. Some figures regarding the minimal amount of the sample are given.

Résumé

On indique les minima pour les dosages micro- ou spectrochimiques de plusieurs oligo-éléments. Il y a corrélation entre les doses minima déterminées par voie spectrochimique à des températures différentes. Finalement on indique quelques données se rapportant aux quantités minima de l'échantillon.

Diskussion

H. *H. Svejda* (Wien): Ich habe nur eine Frage rein technischer Natur: nach der Methode A mit „constant temperature arc"-Anordnung verwenden Sie eine Elektrode mit einem trichterförmigen Einschnitt, in den die Probe gelegt wurde; bei der Methode B war das auf dem von Ihnen gezeigten Bild nicht zu sehen; wurde das nur aus Übersichtsgründen weggelassen oder liegt hier tatsächlich eine andere Elektrodenform vor?

H. *N. W. H. Addink:* Es ist tatsächlich letzteres der Fall; denn bei Verwendung einer solchen Elektrodenform kann man niemals in diese Höhlung hineinkommen. Also haben wir in diesem Fall eine Elektrode mit einer Vertiefung von höchstens 1 mm verwendet. In speziellen Fällen, wenn man mit schwer verdampfbaren Stoffen zu tun hat, ist es am besten, punktförmige Kathoden zu benützen; in diesem Fall wird die ganze Oberfläche abgetastet.

H. *H. Svejda:* Darf ich bitte noch wissen, wie groß die Entfernung der beiden Elektroden ist? Bei der Methode A ist sie ja in der Regel etwa 10 mm. Weiters wird ja das Licht dann durch ein Diaphragma von etwa einem halben Millimeter Durchmesser herausgeblendet; wird das auch hier gemacht?

H. *N. W. H. Addink:* Nein, das geschieht hier nicht. — Der Abstand wird genau auf 2 mm eingestellt.

H. *H. Svejda:* Und wird auch konstant gehalten auf 2 mm, oder darf abgebrannt werden?

H. *N. W. H. Addink:* Ich habe nicht erwähnt, daß die Maximalbrennzeit eine Minute beträgt.

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Universität Münster, Westfalen

Über die Nachweisgrenze in der Spektralanalyse

Von

Herbert de Laffolie

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 12. April 1955)

Ein besonderes Kennzeichen der Spektralanalyse ist die hohe Nachweisempfindlichkeit für die meisten chemischen Elemente. Es ist nun wünschenswert, den Begriff Nachweisempfindlichkeit oder Nachweisgrenze zu präzisieren und durch möglichst zuverlässige Zahlenwerte zu kennzeichnen. Die erste Frage, die dabei auftaucht, lautet: Wodurch tritt überhaupt eine Begrenzung der Nachweisbarkeit einer Spektrallinie auf? Diese Begrenzung tritt dadurch auf, daß die Lichtquelle, z. B. ein Funken oder Bogen, nicht nur die Spektrallinien derjenigen Elemente ausstrahlt, die sich in der Entladung befinden, sondern daß der Linienstrahlung eine kontinuierliche Untergrundstrahlung überlagert ist. Wird die Konzentration eines gesuchten Elementes kleiner und kleiner, dann wird eine herausgegriffene Spektrallinie dieses Elementes um so schwächer, während die Untergrundstrahlung wenigstens annähernd konstant bleibt. Schließlich versinkt die Linie im Untergrund, das betreffende Element ist damit (falls es sich um eine „letzte Linie" handelt) nicht mehr nachzuweisen, die Konzentration ist unter die Nachweisgrenze gesunken. Diese selbst liegt dann an derjenigen Stelle, an der die Linie gerade noch merklich aus dem Untergrund hervortritt.

Um die Nachweisgrenze möglichst weit herabzusetzen, wählt man von vornherein die Anregung so, daß die Untergrundstrahlung möglichst schwach wird. Diese Abschwächung läßt sich durch Verkleinern der Öffnung des Spektrographenspaltes oder durch Übergang auf einen Spektrographen größerer Dispersion erzielen. Ist auf solche Weise eine Arbeitsvorschrift festgelegt, dann wird für diese Arbeitsvorschrift die Nachweisgrenze nur noch durch die Eigenschaften des Strahlungsempfängers bestimmt. In einem direkt anzeigenden Spektralapparat

wie dem Quantometer oder dem Spectro-lecteur automatique bestimmt das Rauschen des Photo-Multipliers in einem Spektralapparat mit photographischer Aufzeichnung des Spektrums die Körnigkeit und Gradation der verwendeten photographischen Emulsion diese Grenze.

Infolge der körnigen Struktur photographischer Emulsionen treten bei kleinen Meßflächen, wie sie bei der Schwärzungsmessung von Spektrallinien verwendet werden, an gleichmäßig belichteten Platten Schwärzungsschwankungen auf, die mit Körnigkeitsstreuung und dem Symbol σS_K bezeichnet werden sollen. Hinzu kommt der Photometrierfehler σS_P, der für die folgenden Betrachtungen so veranschlagt worden ist, daß der Meßfehler an einer von 0 bis 1000 linear geteilten Photometerskala 1 Skalenteil beträgt. Die durch die Körnigkeit und den Photometrierfehler auftretende Streuung der Schwärzung soll mit σS bezeichnet werden. Die Streuung des Logarithmus einer Strahlungsintensität ist $\sigma Y = \frac{\sigma S}{\gamma}$, worin γ die Steilheit der Schwärzungskurve ist. Dabei zeigt sich sogleich die Bedeutung der Entwicklungszeit. In der Abb. 1 ist $\frac{\sigma S}{\gamma}$ an der Stelle $S = 0{,}7$ in Abhängigkeit von der Entwicklungszeit aufgetragen. Das Bild bezieht sich auf Untersuchungen an „Herzog-Spektralplatten, blauempfindlich", die in Kodak D 19 entwickelt worden sind. Diejenige Entwicklungszeit, bei der die Kurve das Minimum durchläuft, ist offenbar die optimale Entwicklungszeit. Die Abb. 2 zeigt σS in Abhängigkeit von der Schwärzung für optimal entwickelte Herzog-Platten unter Verwendung einer Meßfläche von 0,025 mm². Eine Darstellung von $\frac{\sigma S}{\gamma}$ läßt sich nicht gut übersichtlich und für die Praxis brauchbar bringen, weil γ sich mit der Schwärzung ändert und weiterhin für jede Wellen-

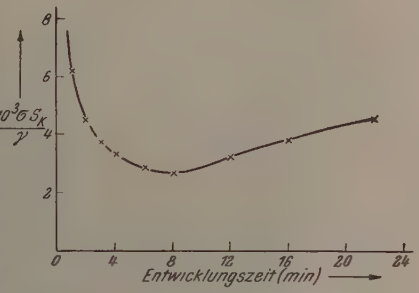


Abb. 1. Zur optimalen Entwicklungszeit

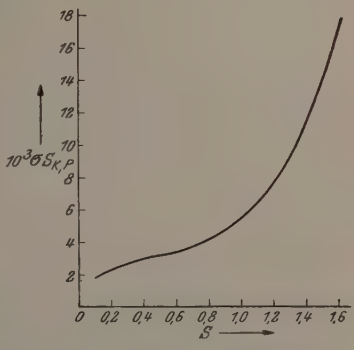


Abb. 2. Körnigkeits- und Meßfehler

länge eine andere Schwärzungskurve gilt. Zweckmäßig operiert man daher nicht mehr mit den Schwärzungen S, sondern transformiert die Schwärzungen und auch die Schwärzungsschwankungen in die *Seidel*-Werte P. Durch die *Seidel*-Transformation wird die Schwärzungskurve

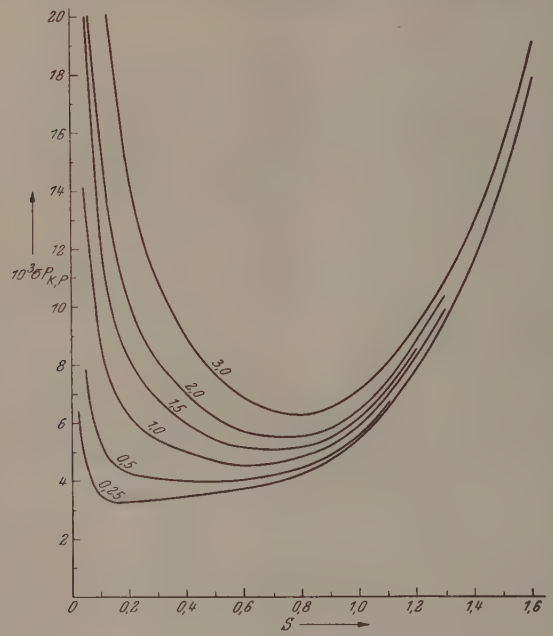


Abb. 3. Streuung von P durch Körnigkeit und Meßfehler

in eine Gerade übergeführt. Der Vorteil der Transformation ist, daß im ganzen Schwärzungsbereich γ konstant ist. In der Abb. 3 ist für verschiedene Transformationskonstanten $\sigma P = \frac{dP}{dS}\,\sigma S$ in Abhängigkeit von der Schwärzung aufgetragen. Bei kleinen Schwärzungen ergeben sich große Werte für σP und damit auch für $\sigma Y = \frac{\sigma P}{\gamma}$. Die Minima der Kurven zeigen diejenigen Schwärzungen an, bei denen σP den kleinsten Wert hat; diese Schwärzungen sind offenbar die optimalen Schwärzungen. Für die Praxis besser geeignet als die „Optimale Schwärzung" ist der Begriff des günstigen Schwärzungsbereiches. In der Abb. 4 ist aus den Kurven des vorhergehenden Bildes der „Günstige Bereich 1,2" in Abhängigkeit von der Transformationskonstanten aufgetragen. Bei

Schwärzungsmessungen innerhalb des durch die beiden Kurven begrenzten Bereiches überschreitet σP nicht das 1,2fache seines Wertes bei der optimalen Schwärzung. σP wird innerhalb dieses Bereiches konstant und gleich dem 1,2fachen seines Wertes bei der optimalen Schwärzung gesetzt.

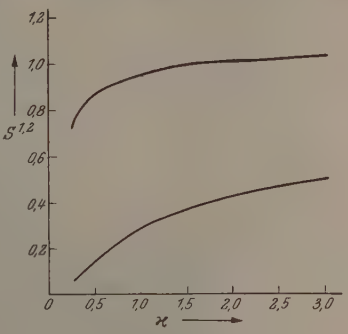


Abb. 4. Günstiger Bereich 1,2

Um von hier aus auf die Nachweisgrenze zu gelangen, ist zu überlegen, wie sich Körnigkeit und Meßfehler bei der Berücksichtigung der Untergrundstrahlung auswirken. Die Rechnung führt zu einer Formel, deren numerische Auswertung die Abb. 5 zeigt. Gemessen werden die durch die Strahlung von Linie und Untergrund gemeinsam erzeugte Schwärzung S_{LU} und neben der Linie die durch die Untergrundstrahlung allein erzeugte Schwärzung S_U. Aus diesen Schwärzungen ergeben sich

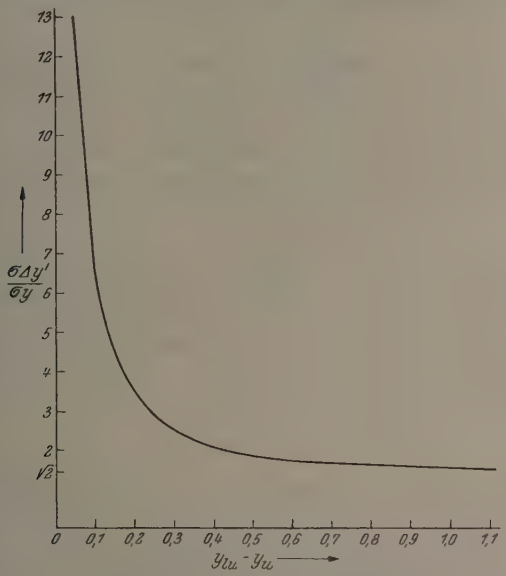


Abb. 5. Fehler bei der Untergrundkorrektur

über die Kennlinie der Photoplatte der Logarithmus der Intensität von Linie + Untergrund Y_{LU} und der Logarithmus der Intensität

des Untergrundes Y_U. Abb. 5 zeigt in Abhängigkeit von der Differenz $Y_{LU} - Y_U$ den Faktor, mit dem σY multipliziert werden muß, um die Streuung für den Logarithmus des Intensitätsverhältnisses zweier Spektrallinien zu erhalten. Letztere ist zumeist auch gleich der Streuung in der Konzentration. Für große Werte von $Y_{LU} - Y_U$ (das heißt, die Intensität der Linie ist groß gegen die des Untergrundes) konvergiert der Faktor zu dem Zahlenwert $\sqrt{2}$ (es sind stets zwei Schwärzungsmessungen notwendig, von denen jede die Streuung σY liefert, daher der Faktor $\sqrt{2}$). Wenn Linie und Untergrund intensitätsgleich sind, ist $Y_{LU} - Y_U = 0{,}3$, der Faktor hat dann den Zahlenwert 2,4. Mit abnehmender Intensität der Linie wird $Y_{LU} - Y_U$ kleiner. Ist $Y_{LU} - Y_U$ schließlich gleich σY geworden, dann ist die Linie von einer zufälligen Schwärzungsschwankung des Untergrundes nicht mehr zu unterscheiden, die Linie ist im Untergrund versunken.

H. Kaiser[1] definiert, daß an der Grenze der Nachweisbarkeit einer Linie $Y_{LU} - Y_U$ den Wert $3 \cdot \sqrt{2} \cdot \sigma Y$ haben soll. Bei einer Wellenlänge von 3750 Å ergab sich für die Herzog-Platten ein σY von 0,003. An der Nachweisgrenze ist damit $Y_{LU} - Y_U = 0{,}013$, das heißt, die Intensität des Untergrundes ist hier rund 30mal so groß wie die der Linie. Für die Streuung der Konzentration an der Nachweisgrenze ergibt sich unabhängig von den Eigenschaften der Emulsion 40%. Durch die Eigenschaften der Emulsion wird aber die Nachweisgrenze selbst festgelegt.

Für einige in der Spektrochemie verwendete Emulsionen hat *P. Spiegelberg*[2] Messungen von Körnigkeit und Steilheit durchgeführt. Aus den Ergebnissen von *P. Spiegelberg* sind in der folgenden Tabelle für die

Tabelle

	4300 Å I_L/I_U	3500 Å I_L/I_U	2800 Å I_L/I_U
Gevaert Super Chromosa ..	1 : 13	1 : 12	1 : 9
Ilford Chromatic	1 : 31	1 : 18	1 : 16
Ilford Ordinary	1 : 26	1 : 18	1 : 14
Kodak SA 2	1 : 29	1 : 21	1 : 17
Agfa Spektral-blau-hart ...	1 : 48	1 : 29	1 : 19
Kodak SA 1	1 : 89	1 : 48	1 : 31
Ilford Process	1 : 71	1 : 47	1 : 33
Ilford Thin Film Half Tone	1 : 145	1 : 64	1 : 30

Wellenlängen 4300, 3500 und 2800 Å die Verhältnisse von Linienstrahlung zur Untergrundstrahlung I_L/I_U an der Nachweisgrenze berechnet worden. Bei größeren Wellenlängen liegen diese Verhältnisse am günstigsten, weil hier die Kennlinien steil verlaufen. Bei den verschiedenen

Emulsionen unterscheiden sich diese Verhältnisse und damit auch die Konzentration an der Nachweisgrenze um mehr als den Faktor 10.

Um für eine gegebene Arbeitsvorschrift die Nachweisgrenze zu berechnen, ist mit chemisch analysierten Proben höherer Konzentration eine auf den Untergrund bezogene Eichkurve aufzustellen und diese bis zu dem Logarithmus desjenigen Intensitätsverhältnisses I_L/I_U zu extrapolieren, das durch die Eigenschaften der verwendeten Emulsion festgelegt ist.

Je härter und je feinkörniger eine Emulsion ist, bei einem um so kleineren Verhältnis I_L/I_U liegt die Nachweisgrenze. Die harten, feinkörnigen Emulsionen sind aber zugleich auch wenig empfindlich. Die Wahl einer solchen Emulsion ist daher nur dann sinnvoll, wenn für die Analyse etwas größere Substanzmengen zur Verfügung stehen, wie es meist dann der Fall ist, wenn der Spektralanalyse keine chemische Anreicherung vorausgeht. Geht eine chemische Anreicherung voraus, dann beträgt die gesamte für die Spektralanalyse zur Verfügung stehende Substanzmenge häufig nur Bruchteile eines Milligramm, die in wenigen Sekunden verdampft sind. In diesem Fall muß man zu empfindlicheren und damit grobkörnigen und weichen Emulsionen greifen.

Zusammenfassung

Der Nachweisbarkeit einer Spektrallinie ist dadurch eine Grenze gesetzt, daß der von der Lichtquelle ausgehenden Linienstrahlung eine kontinuierliche Untergrundstrahlung überlagert ist. Mit abnehmender Intensität einer Spektrallinie versinkt diese schließlich im Untergrund. Die Stelle, an der eine Linie im Untergrund versinkt, ist maßgeblich durch die Eigenschaften der verwendeten Emulsion gegeben, und zwar durch die Körnigkeitsstreuung und die Gradation. Unter Verwendung der *Seidel*-Transformation wird gezeigt, wie sich aus Körnigkeitsstreuung und Gradation dasjenige Intensitätsverhältnis von Linie zu Untergrund bestimmen läßt, bei dem die Linie gerade noch merklich aus dem Untergrund hervortritt. Dieses Verhältnis wird für einige häufig verwendete Emulsionen zahlenmäßig angegeben.

Summary

A limit is set for the detectability of a spectral line by the fact that the line radiation issuing from the light source is overlain by a continuous background radiation. With decreasing intensity of a spectral line, this eventually sinks into the background. The point at which a line sinks into the background is determined basically by the characteristics of the emulsion used and in fact by the granularity distribution and the gradation. By using the *Seidel* transformation it is shown how granularity distribution and gradation can be employed to determine the relation of intensity of line and background at which the line is just still emerging from the background. This relation is given numerically for several emulsions that are frequently used.

Résumé

Le fait qu'une raie spectrale soit utilisable ou non est limité par la superposition d'un fond continu au rayonnement issu de la source. Lorsqu'une raie diminue d'intensité, elle disparait finalement dans le fond continu. Le point où un raie se confond avec le fond continu peut être déterminé à partir des propriétés de l'émulsion utilisée, c'est-à-dire la granulation de l'émulsion et la sensibilité. Grâce à la transformation de *Seidel*, on montre que ces deux grandeurs permettent de mesurer le rapport d'intensité d'une raie et du fond continu, lorsque la raie se détache encore du fond continu. On indique ce rapport pour quelques émulsions d'emploi courant.

Diskussion

H. *G. Hansen* (Oberkochen): Sie haben einen Photometrierfehler eingeführt; das geschieht wohl nur aus praktischen Gründen, weil das Instrument eben erfahrungsgemäß die prinzipiell erreichbare Meßgenauigkeit nicht leistet; denn das ist ja keine grundsätzliche Frage. Es ist ja nicht einzusehen, warum eine Schwärzung nicht beliebig genau zu messen sein sollte.

H. *H. de Laffolie:* Das trifft für das normale Photometer zu, wobei eben auf einer 1 m langen Skala angezeigt wird. Dieser veranschlagte Fehler entspricht aber einem Meßinstrument von der Güteklasse 0,1.

H. *G. Hansen:* Darf ich noch eine zweite Frage stellen: Sie erwähnten Messungen von *Spiegelberg*, der bei verschiedenen Platten und Emulsionen die Körnigkeit gemessen hat. Ist das schon veröffentlicht?

H. *H. de Laffolie:* Ja, das wurde schon in Schweden veröffentlicht.

Literatur

[1] *H. Kaiser*, Spectrochim. Acta **3**, 40 (1947).
[2] *P. Spiegelberg*, Jernkon. Ann. Årg. **131**, 181 (1947).

Aus dem Max Planck-Institut für Metallforschung, Stuttgart

Zur Genauigkeit der Glimmschichtmethode (cathode arc layer)

(Fehlerverringerung durch Anwendung einer gedrehten Kathode)

Von

Gottfried Holdt

Mit 3 Abbildungen

(Eingelangt am 21. April 1955)

Verdampft man beim spektroskopischen Spurennachweis aus der Kathode und nutzt die dabei auftretende Glimmschichtanreicherung (cathode arc layer) nach *Mannkopff* und *Peters*[1] aus, so tritt infolge des Abbrandes der Kathode ein Effekt auf, der die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung beeinträchtigt. Durch ungleichmäßigen Abbrand bekommt die Stirnfläche der Kathode und damit die Anreicherungszone eine von Fall zu Fall wechselnde Neigung zum Spalt des Spektrographen, und erhebliche Schwankungen des Untergrundes, der einzelnen Linien und ihrer Intensitätsverhältnisse können auftreten. Eine einfache apparative Maßnahme, nämlich die Drehung der Kathode um ihre Achse, während des Brandes beseitigt die Folgen des Schiefbrandes.

Es werden Beispiele für das unterschiedliche Verhalten bei Fest- und bei Drehkathode gegeben.

Verwendete Bezeichnungen:

Zusatzlinie: Linie des zu bestimmenden Elements.
Bezugslinie: Linie eines Standardelements.
Y (Y-Wert) = log I, Logarithmus der Intensität einer Linie.
ΔY (Y-Differenz) = $(Y_z - Y_b)$, Logarithmus des Intensitätsverhältnisses von Zusatz- und Bezugslinie.
Parallelreihe: Reihe von Spektren, die in Probe, Anregung und Belichtung gleich sind.
N = Werteumfang einer Parallelreihe.
„Schwankung" einer Linie = $(Y - \overline{Y})$ mit $\overline{Y} = 1/N \cdot \Sigma Y$.

Maximaler Schwankungsunterschied = $(Y_{max} - Y_{min})$ innerhalb einer Parallelreihe.

Schwankungsdiagramm: graphische Darstellung der Y-Werte der Analysenlinien innerhalb einer Parallelreihe gegeneinander in rechtwinkeligen Koordinaten.

Schwankungsgerade: Gerade, die alle Punkte des Schwankungsdiagramms ausgleicht.

Streuung: Quadrat der mittleren quadratischen Abweichung.

c = Konzentration des Zusatzelementes.

Festkathode: Kathode in der üblichen, feststehenden Anordnung.

Drehkathode: Kathode, die um die eigene Achse rotiert.

Der Schiefbrand der Kathode

Man kann beobachten, daß eine zentral gebohrte und gefüllte Kathode von Fall zu Fall verschieden abbrennt, da, anscheinend auf Grund von Materialeinflüssen und Dickenunterschieden, die Wandung der Bohrung ungleichmäßig abgebaut wird. Wesentlich ist dabei, daß sich während des ganzen Brandes die einmal angenommene schiefe Lage der Kathodenstirnfläche kaum verändert. Bei dicker Bohrungswandung wird der Effekt zwar schwächer, doch fehlt er auch hier nicht ganz, da sich beim Abbrand ein dünnerer Kathodenzapfen von selbst ausbildet. Um aber einen von Anfang an ruhig auf der Bohrung stehenden Brennfleck und eine für ein günstiges Verhältnis von Linie zu Untergrund geeignete Verdampfungsgeschwindigkeit zu erreichen, ist es im allgemeinen zweckmäßig, die Bohrungswandung dünn zu wählen, wodurch der Kathodenschiefbrand begünstigt wird.

Je nach der Neigung der Kathodenoberfläche zum Spalt können nun Teile der Anreicherungszone abgeblendet und damit das gesamte Spektrum geschwächt werden. Umgekehrt werden Linien und Untergrund verstärkt, wenn die schiefe Kathodenoberfläche dem Spalt voll zugewandt ist. Dieser Effekt ist statistischen Schwankungen unterworfen. Er bewirkt eine gesteigerte Unsicherheit beim halbquantitativen Linienvergleich sowie eine Erhöhung des Analysenfehlers bei der Messung von Intensitätsverhältnissen.

Die Untersuchungsmethode

Beobachtet man die Kathode auf einem Schirm, so zeigt sich beim Drehen der ungleichmäßige Abbrand sehr deutlich.

Zur Untersuchung des Abbrandeinflusses auf das Schwankungsverhalten einzelner Linien und auf die Streuung von Intensitätsverhältnissen wurde die Kathode synchron mit 100 U/min um ihre Achse gedreht und Vergleiche mit fester Kathode angestellt.

Eine derartige Elektrodendrehung ist bereits von *B. L. Clarke* und *A. E. Ruehle*[2] beziehungsweise von *E. K. Jaycox* und *A. E. Ruehle*[3] angewendet worden, um den Brennfleck und damit die Bogensäule zu stabili-

sieren und so eine Genauigkeitssteigerung zu erreichen. Im Gleich- oder Wechselstrombogen zwischen Kohle- oder Metallelektroden wurde die untere Elektrode (bei Gleichstrom als Anode geschaltet) mit 600 U/min gedreht und der Lichtbogen in den Spektrographen abgebildet.

Dagegen soll die hier angewendete Kathodendrehung eine unterschiedliche Spektrographenausleuchtung vermeiden, wie sie sonst infolge des Schiefbrandes bei Abbildung der Kathodenumgebung von Fall zu Fall zustande kommt.

Der Kathodenschiefbrand wurde für die photographische Registrierung der Spektren untersucht. Es wurden dazu auf der gleichen Platte Parallelreihen von Fest- und Drehkathode aufgenommen und die verschiedenen Y-Werte über die jeweilige Schwärzungskurve bestimmt.

Trägt man nach dem bereits angegebenen Verfahren[4] die Y-Werte der zu vergleichenden Linien in rechtwinkeligen Koordinaten gegeneinander auf, wie dies in den Figuren 1 bis 3 geschehen ist, so erhält man aus jeder Parallelreihe eine Punktmenge gleichen Umfangs. Die Lage der Punkte zueinander erlaubt nun Schlüsse auf das Schwankungsverhalten der einzelnen Linien, auf die Streuung der Y-Differenz und auf etwa vorhandene „Ausreißer" (Meßfehler, Plattenfehler oder zufällige Verunreinigung einer Kohle). Wären überhaupt keine zufälligen Fehler vorhanden, so hätte man alle Punkte genau auf einer Geraden liegend, der sogenannten Schwankungsgeraden, anzunehmen. Die Streuung der Y-Differenz wäre dann gleich Null (sofern die Schwankungsgerade die Steigung Eins hat). Aus der Abweichung der Punkte von der Schwankungsgeraden können also bei Kenntnis der zufälligen Fehler der Intensitätsbestimmung (Kornfehler der Platte, Photometrierung, Rechenauswertung) in schneller und einfacher Weise die dem Verfahren *selbst* anhaftenden zufälligen Fehler abgeschätzt werden.

Messungen

Ein Einfluß des Kathodenabbrandes kann bei der Niobanalyse nach *Holdt* und *Schäfer*[5] festgestellt werden. Für dieses Verfahren zeigt Fig. 1 das Schwankungsverhalten bei Dreh- und Festkathode. Tabelle 1 gibt dazu Werte für den maximalen Schwankungsunterschied verschiedener Linien. Wie zu erwarten, weist der Untergrund die höchste Änderung auf.

Ferner wurde das Verhalten von Al_2O_3 plus zugefügter Beimengungen untersucht. Das Oxyd wurde auf chemischem Wege durch Fällung des Aluminiumhydroxyds, das die gelösten Beimengungen festhält, und anschließendes Glühen hergestellt.

Aufnahmedaten:

Spektrograph: Zeiss Q 24 mit Zwischenabbildung der Kathodenumgebung. Kathodenstirnfläche etwa dreifach vergrößert in der optischen

Achse und in der Mitte einer rechteckigen Zwischenblende von 5 mm Höhe und 14 mm Breite.

Analysenprobe: mit fünf Gewichtsteilen Kohle gemischt und bis zum Rand fest in die Bohrung gestampft.

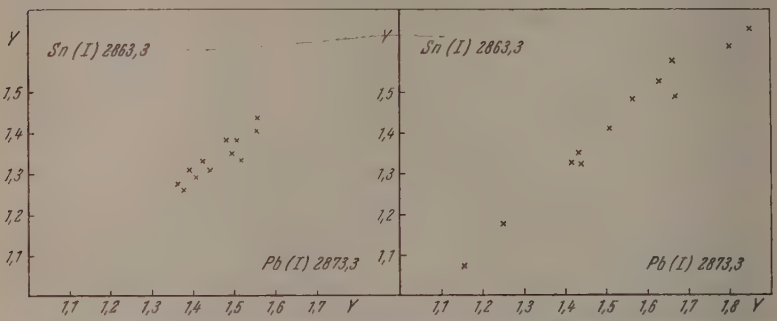


Abb. 1. 0,01% SnO_2 in Nb_2O_5 mit einem Gew.-Teil Kohle. N = 12. PbO als Bezugssubstanz zugemischt. Belichtet über einen bestimmten Verdampfungsabschnitt

Tabelle 1. Verhalten der *Y*-Schwankungen bei Drehkathode und Festkathode

Zinn-Bestimmung in Niob(V)-Präparaten nach *G. Holdt* und *H. Schäfer*[5]

	Linie		Maximaler Schwankungsunterschied $(Y_{max} - Y_{min})$		
			N	Drehkathode	Festkathode
0,01% SnO_2 ...	Sn(I)	2863,3	12	0,2$\bar{0}$	0,6$\bar{0}$
PbO und GeO_2	Nb(F)	2868,5		0,32	0,70
als Standard	Pb(I)	2873,3		0,20	0,70
zugefügt ...	Ge(I)	2691,3		0,2$\bar{0}$	0,5$\bar{0}$
1,0% SnO_2, ...	Sn(I)	2863,3	12	0,1$\bar{0}$	0,30
PbO und GeO_2	Nb(F)	2868,5		0,3$\bar{0}$	0,4$\bar{0}$
als Standard	Pb(I)	2873,3		0,20	0,53
zugefügt ...	Ge(I)	2691,3		0,13	0,3$\bar{0}$
	UG bei	2870*		0,04	0,20

* Gemittelter Untergrund, an je drei benachbarten Stellen gemessen.

Kohlen: Graphit, Sorte RW I der Ringsdorff-Werke.

Anode: oben, 20 mm lang mit planer Fläche von 5 mm Durchmesser.

Kathode: unten, 20 mm lang mit Bohrung von 1,4 mm Durchmesser und 6 mm Tiefe. Angedrehter Zapfen von 10 mm Länge und 2,6 mm Durchmesser.

Tabelle 2. Verhalten der Y-Schwankungen und Analysenfehler bei Drehkathode und Festkathode. Vollständige Verdampfung von Al_2O_3 plus Beimengungen mit fünf Gew.-Teilen Kohle gemischt.

	Größenordnung der Beimengung	Zusatzlinie Bezugslinie	Maximaler Schwankungsunterschied ($Y_{max} - Y_{min}$)		Mittlerer relativer Analysenfehler $\frac{s(c)}{c}$		N
			Drehkathode	Festkathode	Drehkathode	Festkathode	
1	0,005% Ti	Ti(II) 3234,5 Al(I) 3050,1	0,13 0,16	0,22 0,30	8%	11.5%	23
2	0,01% Mo	Mo(I) 3170,3 Al(I) 3050,1	0,12 wie 1	0,27	8%	13%	23
3	0,005% V	V(I) 3185,4 Al(I) 3050,1	0,15 wie 1	0,22	10%	10%	23
4	0,005% V	V(I) 3185,4 Mo(I) 3170,3	wie 3 wie 2		10%	8%	23
5	0,03% Cr	Cr(I) 3021,6 Al(I) 3050,1	0,13 wie 1	0,24	6%	12%	23
6	0,03% Cr	Cr(II) 2835,6 Al(II) 2816,2	0,14 0,17	0,24 0,51	7%	28%	24
7	0,003% Mg	Mg(I) 2852,1 Al(I) 3050,1	0.13 wie 1	0,24	8%	11%	23
8	0,1% Sb	Sb(I) 2598,1 Fe(II) 2599,4	0,17 0,10	0,31 0,22	6%	13%	11
9	0,005% Mn	Mn(II) 2593,7 Al(I) 2568,0	0,16 0,08	0,25 0,24	9%	8%	23
10	0,005% Mn	Mn(I) 2801,1 Al(II) 2816,2	0,14 wie 6	0,19	11%	29%	24

Elektrodenabstand: 4 mm, konstant gehalten.
Stromstärke: 10 Amp., Vorwiderstand konstant.
Zündung: mechanisch.
Belichtung: von Zündung bis zum völligen Verbrauch der Füllung, ca. 2' 45".

Bei dieser Verdampfungsmethode sitzt der Brennfleck sofort ruhig auf der Bohrung. Substanzverluste durch Versprühen bei der Zündung sind sehr gering. Gegen Brandende springen einzelne Schmelzeperlen, die sich außen am unteren Teil des Abbrandzapfens der Kathode gebildet haben, fort. Höherer Kohlezusatz würde dies vermutlich verhindern*.

Tabelle 2 gibt die gemessenen Werte für den maximalen Schwankungsunterschied verschiedener Linien bei Dreh- und Festkathode, sowie den mittleren relativen Analysenfehler (unter der vereinfachenden Annahme einer Steigung Eins der Eichgeraden) für verschiedene Linienpaare. In *allen* Fällen tritt durch die Drehung der Kathode eine Verringerung

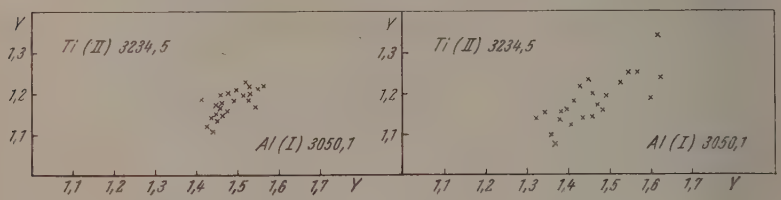


Abb. 2. Ca. 0,005% Ti in Al_2O_3 mit fünf Gew.-Teilen Kohle. N = 23. Belichtet über die vollständige Verdampfung

des maximalen Schwankungsunterschiedes der einzelnen Linien ein. Wichtig ist, daß der relative Analysenfehler ebenfalls sinkt (der Widerspruch für die Linienpaare 3 und 4 ist durch einzelne, stark abweichende Punkte des Schwankungsdiagramms erklärbar). Abb. 2 zeigt als Beispiel das Schwankungsdiagramm für ein Ti/Al-Paar.

Abb. 3 zeigt das auffällige Schwankungsverhalten der Linie Al(II) 2816,2. Hier wird der maximale Schwankungsunterschied durch Anwendung der Drehkathode besonders stark herabgesetzt, was für die übrigen gemessenen II-Linien nicht der Fall ist. Es ergibt sich eine Schwankungsgerade mit der Steigung $w < 1$. In diesem Fall läßt sich der Analysenfehler auch durch Gewichtserteilung am Intensitätsverhältnis[4] auf fast den gleichen Wert herabdrücken wie mit der Drehkathode. Das gleiche Verhalten vor der Kathode war dort bereits für die Linie Mg(II) 2791 gefunden worden. Diese beiden Linien entsprechen höheren Termüber-

* Bei der Verdampfung von NiO mit 40 Gewichtsteilen Kohle nach der gleichen Methode waren Substanzverluste gegen Brandende nicht mehr feststellbar.

gängen, deren verstärktes Auftreten in einer sehr schmalen Zone vor der Kathode bereits von *Mannkopff*[6] beobachtet wurde. Es ist klar, daß sich in diesem Falle der Kathodenschiefbrand besonders stark auswirken muß.

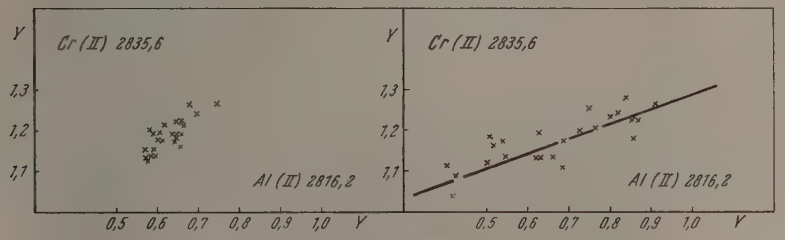


Abb. 3. Ca. 0,03% Cr in Al_2O_3 mit fünf Gew.-Teilen Kohle. N = 23. Belichtet über die vollständige Verdampfung

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, daß bei Ausnützung der Glimmschichtanreicherung (cathode arc layer) Ungleichmäßigkeiten beim Abbrand der Kathode zu Intensitätsfehlern Anlaß geben. Durch Drehung der Kathode während des Brandes läßt sich dieser Einfluß ausschalten. Auf diese Weise wird der maximale Schwankungsunterschied der einzelnen *Y*-Werte und die Streuung der *Y*-Differenzen herabgesetzt sowie der Untergrund konstant gehalten. Es wird damit die halbquantitative Abschätzung durch Linienvergleich erleichtert und die quantitative Bestimmung durch Messung von *Y*-Differenzen verbessert. Das einfach zu zeichnende Schwankungsdiagramm ermöglicht ohne Rechnung einen Überblick über die Leistungen eines Analysenverfahrens. Es bestehen Zusammenhänge zu dem bereits beschriebenen[4] unterschiedlichen Schwankungsverhalten von Analysenlinien, das durch Gewichtsanwendung am Logarithmus des Intensitätsverhältnisses beseitigt werden kann.

Summary

By using the cathode arc layer, it could be shown that irregularities in the consumption of the cathode lead to intensity errors. Rotating the cathode during the burning will eliminate this influence. In this way the maximum fluctuation difference of the individual Y-values and the scattering of the Y-differences is decreased, and also the background can be kept constant. The half—quantitative estimation by line comparison is facilitated in this way and the quantitative determination by measurement of Y-differences is improved. The fluctuation diagram, which is easily drawn, makes it possible to obtain, without calculation, an overview of the accomplishments of an analytical procedure. There are relationships with the previously described[2] variablo fluctuation behavior of analysis lines, which can be excluded by weighting the logarithm of the intensity relationship.

Résumé

On a pu démontrer que lors de l'utilisation de la méthode de la couche cathodique, des irrégularités dans la combustion de la cathode introduisent des variations d'intensité. Celles-ci peuvent être éliminées en faisant tourner l'électrode pendant que l'arc jaillit. On augmente ainsi la précision maximum pour les valeurs de Y et abaisse la dispersion des différences entre les Y, en même temps qu'on maintient constant le fond continu. La recherche semi-quantitative par comparaison des raies est ainsi facilitée et le dosage par mesure des différences des Y est amélioré. Le diagramme des fluctuations permet de se rendre compte sans calcul des meilleures conditions d'utilisation de la méthode. Il existe des corrélations entre les évolutions des fluctuations variables des raies d'analyse déjà décrites; on peut les éliminer en introduisant des poids affectant le logarithme de l'intensité dans la relation fondamentale.

Diskussion

H. *F. X. Mayer* (Wien): Wie sind die Umdrehungszahlen?

H. *G. Holdt:* Das waren 100 Umdrehungen in der Minute, fast 2 in der Sekunde.

H. *H. Neuninger* (Wien): Ist der Schiefbrand der Elektrode nicht weitgehend beeinflußt von dem Durchmesser der Gegenelektrode?

H. *G. Holdt:* Nein, merkwürdigerweise gar nicht.

H. *H. Neuninger:* Haben Sie Experimente mit dünner Gegenelektrode gemacht?

H. *G. Holdt:* Ich habe in früheren Zeiten die Elektrode konisch als Kegelstumpf aufgelegt, habe das dann aber nicht mehr gemacht. Mit spitzer Anode habe ich keine Versuche gemacht, weil dann der Bogen zischt und die Glimmschichtausbildung gestört wird.

H. *H. Neuninger:* Nein, ich meine jetzt eine Gegenelektrode mit etwa 2 bis 3 Millimeter Durchmesser.

H. *G. Holdt:* Ja, als Anode geschaltet. Da zischt der Bogen. Es werden dann Stromstärken von 10 Ampere angelegt. Die zulässige Stromdichte an der Anode wird überschritten, Sie bekommen einen Zischbogen und können ihn nicht verwenden für die Glimmschichtmethode. Der Schiefbrand ist bedingt durch ungleichmäßigen Abbrand der Kohlenwandungen. Es kann sein, daß die Kohle schlecht gebohrt ist, aber auch wenn die Kohle gut gebohrt ist, erfolgt ungleichmäßiger Abbrand, wie es an und für sich zu erwarten ist. Bei RW II-Kohlen wird diese Zischstrahlung noch viel stärker.

H. *H. Neuninger:* Ja, das ist Graphitmaterial.

Literatur

[1] *R. Mannkopff* und *Cl. Peters*, Z. Physik **70**, 444 (1931).

[2] *B. L. Clarke* und *A. E. Ruehle*, Bell System Techn. J. **17**, 381 (1938).

[3] *E. K. Jaycox* und *A. E. Ruehle*, Proceedings of the Seventh Summer Conference on Spectroscopy and its Applications, p. 10 — The Massachussetts Institute of Technology (1940).

[4] *G. Holdt*, Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 286.

[5] *G. Holdt* und *H. Schäfer*, Z. analyt. Chem. **146**, 4 (1955).

[6] *R. Mannkopff*, Physik **76**, 403 (1932).

Aus dem Chemischen Untersuchungsamt der Stadt Stuttgart

Eine spektrochemische Mikrobestimmung des Bleis in biologischem Material

Von

K. Pfeilsticker

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 6. April 1955)

Für die sichere Erkennung einer Bleivergiftung ist die Bleibestimmung im Blut und in anderem biologischem Material oft entscheidend. Da es sich dabei häufig um Gehalte unter 1 μg/g und um kleine Probemengen handelt, bietet die Analyse einige Schwierigkeiten, die durch die Allgegenwart und durch die Flüchtigkeit des Bleis noch vermehrt werden. Die Bestimmung mit Dithizon, die auf *H. Fischer* zurückgeht, wurde von zahlreichen Analytikern auf die Untersuchung von biologischem Material angewandt und eingehend ausgearbeitet. Auch eine polarographische Methode führt zu guten Ergebnissen.

Für die spektrochemische Bestimmung des Bleis in biologischem Material wurden schon mehrere Verfahren angegeben. So hat das *Kettering*-Laboratorium[1] sich nicht mit der chemischen Bestimmung allein begnügt, sondern große Analysenreihen auch spektrographisch ausgeführt. *Danielsson*[2] verwendet den Kohlebogen in Verbindung mit einem großen Spektrographen. Dadurch gelingt es ihm, das Blei direkt in der Asche zu bestimmen. Nach *Brustier*, *Cornec* und *Triche*[3] genügt es schon, das Blut einzutrocknen und zu verreiben, um das Blei im hochfrequenzgezündeten Abreißbogen bestimmen zu können. *Schrader*[4] arbeitet mit der Glimmschichtmethode nach *Mannkopff*. In der Kathoden-Glimmschicht eines Kohlebogens werden die Linien des Bleis und vieler anderer Kationen besonders intensiv ausgestrahlt.

Steht nur ein Spektrograph mittlerer Dispersion zur Verfügung (z. B. der Q 24 von Zeiss), so ist eine Anreicherung des Bleis in der Asche notwendig. Ein besonders einfaches und sicheres Anreicherungsverfahren ist, wie wir gefunden haben, das Ausziehen der Hauptmineralstoffe (Na,

K, Ca, Mg, P) mit einem „Reagens⁵". Das Reagens besteht aus einer Kombination der organischen Schwermetallfällungsmittel Pyrrolidindithiocarbamat, 8-Hydroxychinolin und Anthranilsäure, die in Acetat-Phthalat-Puffer vom pH 4,8 gelöst sind. Es ist auch für die Anreicherung anderer Elemente als Blei anwendbar. Blei und andere Spurenelemente wandeln sich mit dem Reagens in schwerlösliche Verbindungen um und bleiben im Ungelösten zurück*. Obwohl sie nur in Spuren vorliegen, sind sie doch am Ort der Reaktion in verhältnismäßig großer Konzentration anwesend. Verluste sind deshalb weniger zu befürchten als bei Fällungen, auch wenn die Fällung in Gegenwart von Spurenfängern vorgenommen wird. Das von uns angewandte Verfahren schien uns für Reihenanalysen auch einfacher zu sein als die Extraktion des Bleis mit Dithizon. Außerdem hat es den Vorzug, daß die ganze Manipulation in einem Quarzschälchen vor sich gehen kann. Glasgefäße, die auch nach intensiver Reinigung immer wieder Blei abgeben können, sind vermieden.

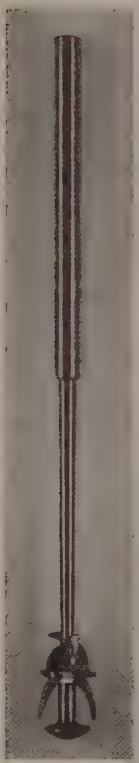


Abb. 1. Rührer und Zerteiler aus nichtrostendem Stahl. Durchmesser an den Flügeln: 11 mm, Höhe: 20 mm. Für 8 ml-Venülen

Die Lichtstärke mittlerer Spektrographen ermöglicht es, mit kleinen Substanzmengen auszukommen. 2 ml Vollblut oder 4 ml Serum genügen für zwei Parallelbestimmungen des Normalbleigehaltes. Daraus ergibt sich nebenbei auch eine Zeitersparnis, weil nur kleine Mengen Analysenmaterial verarbeitet werden müssen.

Die Homogenisierung des Vollbluts

Ein Problem bildete aber die notwendige Homogenisierung von geronnenem Blut. Der Blutkuchen enthält ja viel mehr Blei als das Serum. Man kann zwar Zitratvenülen verwenden, die auch genügend bleifrei sind. Abgesehen davon, daß bei der Blutentnahme das Blut mit der Zitratlösung nicht immer ausreichend gemischt wird, muß das zugesetzte Flüssigkeitsvolumen bei wechselnden Blutmengen berücksichtigt werden. Wir sind deshalb von Zitratvenülen wieder abgekommen und haben verschiedene andere Wege versucht. So haben wir die gesamte Blutmenge in Kohle verwandelt und einen aliquoten Teil der Kohle nach sorgfältiger Zerreibung weiterverarbeitet. Dadurch verzichtet man aber auf die erwähnte Zeitersparnis. Später haben wir das Blut dadurch

* Das Blei wird während des ganzen Verfahrens nicht in Lösung gebracht, es liegt von der Trocknung ab immer in fester Form vor.

homogenisiert, daß wir auf etwa 5 ml Blut 0,1 ml mit Dithizon gereinigte 50%ige Kalilauge zusetzten. Der Blutkuchen läßt sich anschließend leicht zerteilen. Nach einiger Zeit wird das Blut jedoch zähflüssig und in manchen Fällen auch fest. Als der beste Weg erscheint uns heute die Zerteilung des Blutkuchens mit einem Rührer aus nichtrostendem Stahl in der Form eines Starmixrührers (Abb. 1). In 20 Sekunden ist der Blutkuchen gleichmäßig und fein zerteilt.

Die Extraktion der Hauptmineralstoffe

Die Veraschung erfolgt in Quarz- oder Platinschalen (Abb. 2). Eine Erhitzung über freier Flamme ist unbedingt zu vermeiden. Über freier

Abb. 2. 10-ml-Platin- und Quarzschalen, halbrund, ohne Ausguß, Platinfilterstäbchen und Platinspatel

Flamme wird die Temperatur trotz aller Vorsicht örtlich leicht so hoch, daß Bleiverluste auftreten*. Die der Veraschung vorausgehende Verkohlung muß im Luftbad vorgenommen werden, die Veraschung selbst erfolgt im Muffelofen. Wenn die Veraschungstemperatur 500° C nicht übersteigt, sind keine Bleiverluste zu befürchten, namentlich nicht, solange noch Kohle vorhanden ist und bei Anwesenheit von Phosphorsäure.

Auch bei der Extraktion der Asche mit dem erwähnten Reagens entstehen keine Bleiverluste, die zu beachten wären. *Pohl*[6] berichtet zwar von Blei-, Chrom- und Manganverlusten, wenn diese Elemente mit Pyrrolidindithiocarbamat bei p_H 4 gefällt werden. In besonderen Versuchen haben wir uns aber davon überzeugt, daß bei unserer Art der Anreicherung durch Extraktion der Hauptmineralstoffe bei p_H 4,8 weniger als 1% des Bleis in Lösung gehen. Dazu wurden die vereinigten Filtrate von 16 Einzelanalysen der gleichen Blutprobe ihrerseits wieder auf Blei analysiert. Es ergab sich weniger als der 6. Teil des in einer Probe vorhandenen Gehalts, auf das Filtrat einer Einzelanalyse umgerechnet also ein Verlust von insgesamt etwa 1%. Bei der Frage der Löslichkeit des

* Die Bleiverluste fallen besonders bei kleinen Bleimengen ins Gewicht. Mitunter wird überhaupt kein Blei mehr gefunden.

Bleis und anderer Spurenelemente ist noch zu berücksichtigen, daß das bei der Extraktion schon anwesende Bezugselement in kleinsten Spuren ebenfalls extrahiert wird. Sind die extrahierten Anteile des Analysen- und des Bezugselements gleich groß, so entsteht überhaupt kein Fehler.

Damit auch Calciumsulfat gelöst wird, enthält das Reagens eine größere Menge Ammoniumacetat, das gleichzeitig als pH-Puffer wirkt. Als zweite Puffersubstanz mit einem etwas anderen pH-Bereich ist Phthalat anwesend. Bei der Herstellung erzeugt man im Reagens einen Niederschlag, um die letzten Schwermetallverunreinigungen zu entfernen. Nach der Einwirkung auf die Kohle oder Asche wurde das Reagens ursprünglich mit Platinfilterstäbchen nach *Emich* abgesaugt. Wir hatten die Absicht, Papierfilter mit ihren kaum völlig zu beseitigenden Verunreinigungen zu vermeiden. Während sich aber Kohle gut absaugen läßt, verstopft Asche das Filterstäbchen rasch. Durch Ausglühen und Durchsaugen von Salzsäure wird die ursprüngliche Porosität zwar wieder hergestellt, die Filterstäbchen leiden aber unter dieser Behandlung und werden nach einiger Zeit reparaturbedürftig. Wir stellen die Filterstäbchen deshalb jetzt aus Plexiglas her. Sie haben eine Siebplatte mit etwa 100 Bohrungen von 0.3 mm Durchmesser (Abb. 3)*. Die 9-mm-Papierfilterchen werden mit einem besonderen Stanzer aus nichtrostendem Stahl (Abb. 3) ausgestanzt

Abb. 3. Siebfilterstäbchen aus Plexiglas, 6 mm und 1 cm äußerer Durchmesser, zwei 9-mm-Filterchen mit Fortsatz. Stanzer aus nichtrostendem Stahl, links Öffnung zum Ausstoßen des ausgestanzten Filterpakets

und mit spektralreiner Salzsäure gereinigt. Um die Menge der zurückbleibenden Verunreinigungen noch weiter herabzusetzen, kann der Durchmesser auf 5 mm verkleinert werden. Die Filterchen haben einen kleinen Fortsatz, an dem sie nach Aufhebung des Vakuums leicht vom Filterstäbchen abgehoben werden können. In der Saugleitung befindet sich eine mit dem Finger verschließbare Öffnung zum raschen Wechsel des Vakuums und des normalen Luftdrucks.

* Zone der Bohrungen 6 mm Durchmesser.

Das Bezugselement

Als Bezugselement wird Indium zugesetzt, das bei einer ähnlichen Temperatur verdampft wie Blei[5, 7]. Wesentlich ist, daß das Bezugselement in der Probe homogen verteilt wird. Bei festen Proben geht man so vor, daß man sie zunächst in Kohle verwandelt. Zur Kohle wird die Bezugslösung und außerdem die nachher zu besprechende „Zusatzlösung" zugegeben. Hierauf trocknet und verkohlt man von neuem. Die organische Substanz der Zusatzlösung verhindert, daß sich die Bezugselemente an der Wand der Schale festsetzen. Sind in der ursprünglichen Probe keine oder nicht genügend organische Substanzen vorhanden, so wird ebenfalls Zusatzlösung zugegeben, z. B. zu Urin oder zu enteiweißtem Serum.

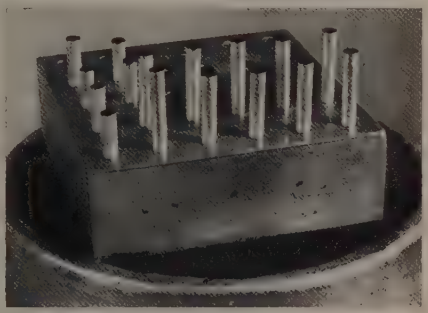


Abb. 4. 5-mm-Aluminiumelektroden mit Haftlösung, Al-Block auf Heizplatte mit Wärmeregulierung

Die Haft- oder Zusatzlösung

Um die angereicherte Asche auf den ebenen Hilfselektroden festzuhalten, verwenden wir eine Haft- oder Zusatzlösung[8]. Sie enthält ein leicht herzustellendes, braunes Kondensationsprodukt aus Glukose, Glykokoll und Harnstoff und bildet nach dem Eintrocknen auf der Elektrode einen festhaftenden lackartigen Überzug, der die Asche einschließt und mit der Elektrode verbindet (Abb. 4 und 5). In vielen Fällen wie hier bei der Bleibestimmung enthält die Haftlösung auch spektrochemische Puffer, und zwar kleine Mengen der Hauptmineralstoffe, wenn es sich um die Analyse von biologischem Material handelt. In der angereicherten Asche bleiben kleine, wechselnde Mengen dieser Mineralstoffe zurück, die von den zugesetzten Puffersubstanzen ausgeglichen werden. Die mit Puffern versetzte Haftlösung nennen wir Elektrodenlösung. Das Überführen der Asche auf die Elektrode geschieht am besten mit schräg zugeschnittenen Federkielen. Sie sind dünner als kleine Hornlöffel und können zur Reinigung jederzeit nachgeschnitten werden.

Abb. 5. Eine 3-mm- und eine 5-mm-Elektrode mit eingetrockneter Haftlösung

Die Vermeidung von Fremdblei

Es ist nicht überflüssig, besonders darauf hinzuweisen, daß die Einschleppung von Fremdblei peinlich vermieden werden muß. Blut darf unter keinen Umständen mit einer Rekordspritze entnommen werden. Tabelle 1 gibt einen Versuch wieder, den wir gemeinsam mit dem Landes-

Tabelle 1. Einfluß der Blutentnahme mit Venüle, Glasspritze und Rekordspritze. Spritzen gemeinsam sterilisiert. Bleigehalt des Wassers vor und nach dem Auskochen der Instrumente

Blutprobe	Entnommen mit		
	Venüle	Glasspritze	Rekordspritze
	µg Pb in 100 ml		
1	50	74	176
2	45	66	77
3	83	102	220
4	119	138	>1000
5	37	34	94
6	40	58	127

Destilliertes Wasser: 30 µg Pb/l
Kochwasser: 210 µg Pb/l

gewerbearzt von Baden-Württemberg, Herrn Dr. *Hoschek*, ausgeführt haben. Die Entnahme mit einer Rekordspritze verfälscht die Ergebnisse vollkommen. Aber auch Glasspritzen, die zusammen mit Rekordspritzen ausgekocht wurden, verursachen schon zu hohe Bleiwerte*. Das Kochwasser nimmt von den Rekordspritzen nicht unerhebliche Mengen Blei auf. Auch der Sterilisator darf selbstverständlich kein Blei abgeben. Es ist deshalb am sichersten, zur Blutentnahme Venülen zu verwenden.

Die Quarzschalen, in denen die Veraschung vorgenommen wird, dürfen früher nicht zur Erhitzung bleihaltiger Substanzen benützt worden sein. Auch nach intensivster Reinigung, Ausschmelzen mit Kaliumhydrogensulfat oder Behandlung mit Flußsäure, sind die Schalen nicht wieder brauchbar, die Analysen fallen stets zu hoch aus. Bleiplatten dürfen sich nicht in der Nähe befinden, so daß die verwendeten Geräte mit ihnen in Berührung kommen können. Alle benutzten Geräte und Schalen werden mit verdünnter Salpetersäure gereinigt, Glasstäbe werden mit Chlorsilanen** hydrophobiert, Pinzetten haben Kunststoff-

* Darauf hat auch *Wa. Gerlach* hingewiesen: Zeiss-Nachrichten, 3. Folge, Juli 1939, Methoden und Anwendungen der Emissionsspektralanalyse in der medizinischen Praxis und Forschung. Die Bleiaufnahme wird dort auf eine Bleidichtung der Rekordspritze zurückgeführt.

** Siliconölemulsion Bayer H und Alkylchlorsilan zur Hydrophobierung wurden uns von den Farbenfabriken Bayer Leverkusen zur Verfügung gestellt.

spitzen. Nur quarzdestilliertes Wasser, das in Flaschen aus Kunststoff aufbewahrt wird, ist genügend bleifrei, alle Reagenzien und Zusätze werden besonders gereinigt, auch wenn sie aus analysenreinen Materialien hergestellt worden sind. Auch sie werden grundsätzlich in Flaschen aus Kunststoff aufbewahrt.

Umgekehrt müssen zur Vermeidung von Bleiverlusten die Glasgefäße, in denen Harn eingeliefert wird, mit ein wenig warmer verdünnter Salpetersäure nachgespült werden. Blei wird leicht von Glaswandungen adsorbiert und ist besonders auch in Trübungen enthalten. Auch für die Aufbewahrung von Harn sind Kunststoffgefäße vorzuziehen.

Die Testproben

Für die Bleibestimmung im eisenreichen Vollblut wären Teste mit verhältnismäßig großem Eisengehalt erforderlich, die Teste für anderes Analysenmaterial sollten dagegen weniger Eisen enthalten. Es hat sich aber gezeigt, daß man eine einheitliche Testreihe für alle Proben verwenden kann, wenn den Testen ein Viertel der im Vollblut enthaltenen Eisenmenge zugesetzt wird. Diese Eisenmenge wird auch zu allen Analysenproben mit Ausnahme des Vollblutes gegeben. Das Intensitätsverhältnis Bleilinie/Indiumlinie wird durch die Verringerung der Eisenmenge nicht verändert.

Die Teste werden am besten in Form der Asche aufbewahrt. Sie enthalten etwa ebensoviel Hauptmineralstoffe wie nach der Anreicherung in der Blutasche zurückbleiben. Obwohl die Teste künstlich hergestellt werden, sind sie doch der angereicherten Asche des Blutes und der Organe genügend ähnlich. Außerdem haben Unterschiede von Probe und Test keine große Bedeutung, weil sich das Bezugselement Indium ähnlich verhält wie Blei.

Die Aufnahme

Die Anregung erfolgt mit dem hochfrequenzgezündeten Wechselstromabreißbogen mit 220 V Betriebsspannung und nur 10 Ohm Vorwiderstand. Ein hochbelasteter Abreißbogen ist nach unseren Erfahrungen empfindlicher und auch genauer als ein normaler. Es wird so lange abgefunkt, bis das Analysenmaterial gerade vollständig verdampft ist (15 Sekunden).

Bemerkungen zur Auswertung der Aufnahme

Die Bleilinie 2833 Å kann, soweit es sich um die Analyse von Vollblut mit einem mittleren Spektrographen handelt, wegen der unmittelbar benachbarten starken Eisenlinie 2832,4 Å nicht ausgewertet werden.*

* Ist die Dispersion genügend groß, wie z. B. beim neuen Spektrographen 110 M (Fuess), so ist Pb 2833 vorzuziehen. Die Eisenlinie muß nicht nur getrennt sein, sie darf auch keinen Einfluß ausüben.

Die von uns verwendete Bleilinie 4057,8 Å fällt zwar mit der schwachen Eisenlinie 4058,2 direkt zusammen, diese Eisenlinie stört aber erst bei sehr kleinen Bleigehalten, die für die Diagnose einer Bleivergiftung keine Rolle spielen. Außerdem kann die etwas stärkere, benachbarte Eisenlinie 4055,0 Å als Kontrolle benutzt werden. Bei größeren Mangangehalten (Stuhl) kann auch Mn 4058,0/9 Å stören. Kontrolle = Mn 4055,5 Å.

Obwohl die Indiumlinie 4102 Å in der Nähe der Bleilinie liegt, ist doch die Indiumlinie 3258,6 Å (nicht 3256 Å) als Bezugslinie vorzuziehen, weil die zuerst genannte Linie eine große Selbstabsorption zeigt und außerdem auf einem oft starken, anscheinend durch eine Calciumverbindung verursachten Bandenuntergrund liegt. Bei der Auswertung mit dem Rechengerät nach *Kaiser*[9] werden die verschiedenen Kontrastfaktoren der Analysen- und der Bezugslinie berücksichtigt, bei beiden Linien wird der spektrale Untergrund ausgeschaltet. Für beide Linien kann die gleiche Schwärzungstransformation angewandt werden, weil es mit Untergrundkorrektur von untergeordneter Bedeutung ist, ob die Schwärzungslinie möglichst genau gerade gestreckt wird.

Da stets Teste und manchmal auch Kontrollösungen mit aufgenommen werden, ist die Anwendung eines Brückenspektrums, für das sich Eisenlinien anbieten würden, nicht erforderlich, obwohl die Schwärzungskurven in den beiden Wellenlängenbereichen sehr verschieden sind.

Im Normalblut finden wir 20 bis 40 μg Blei in 100 ml, im Normalserum etwa 10 μg. Bleiarbeiter können 60 bis 80 μg Blei in 100 ml Blut und darüber aufweisen, ohne bleikrank zu sein, oft zeigen sich aber von etwa 70 μg ab Tüpfelzellen und Porphyrin im Urin. Bei höheren Bleigehalten liegt sehr häufig eine Bleivergiftung vor, in schweren Fällen haben wir bis zu 300 μg Blei in 100 ml gefunden.

Tabelle 2. Bleianalysen mit verschiedenen Methoden

	mit Dithizon*	polarographisch*	spektrochemisch
	mg Pb in 100 g		
Leber 1	0,44	0,45	0,38
2	0,25	—	0,29
3	0,20	0,25	0,16
4	1,13	—	1,07
5	0,57	0,61	0,53
Blut	0,045 und 0,037	0,043	0,040

* Die mit der Dithizonmethode und polarographisch ermittelten Analysenwerte gehen auf eine Gemeinschaftsarbeit des Chemiker-Ausschusses der Gesellschaft Deutscher Metallhütten- und Bergleute zurück.

Der mittlere Fehler $\sqrt{\frac{\Sigma v^2}{n-1}}$ aus 16 Probenwerten (32 Einzelwerten)

des gleichen Blutes ergab sich zu $\pm$ 5,4% (v Abweichung vom Mittel, n Anzahl der Proben), aus den 32 Einzelwerten zu $\pm$ 7,0%. Ein Vergleich der spektrochemischen Analyse mit der Dithizonmethode und der polarographischen Bestimmung zeigte eine befriedigende Übereinstimmung der Resultate (Tabelle 2). Bei genügender Ausrüstung, namentlich mit Schalen, kann ein Analytiker im Tag etwa 16 Proben untersuchen. Auf die gleiche Weise können auch Mn, Cu, Zn, Cd, Cr und andere Elemente im Vollblut bestimmt werden, wenn die Teste geeignete Mengen dieser Elemente enthalten und als Bezugselemente noch Palladium und Gallium hinzugefügt werden. In anderem biologischem Material gewinnt die Bestimmung an Empfindlichkeit, wenn man auf die Zugabe von Eisen verzichtet und Elektroden mit nur 3 mm Durchmesser verwendet.

Gang der Analyse

Geräte:

10-ml-Quarz- oder -Platinschalen, halbrund, ohne Ausguß; für Urin 30-ml-Schalen;
Siebfilterstäbchen aus Plexiglas;
Papierfilter mit Fortsatz*, 9 mm Durchmesser, mit warmer spektralreiner HCl in Quarzschale gereinigt;
Al-Elektroden, 5 mm Durchmesser, 99,9985% Al**;
Al-Trockenblock mit Temperaturregulierung;
Rührer aus nichtrostendem Stahl von besonderer Form, etwa 3000 U/Min.
Lösungen, in Flaschen aus Kunststoff aufbewahrt:

HCl, isotherm destilliert (Abrahamczik):

Kunststoff- oder Quarzschalen mit quarzdestilliertem Wasser 2 Tage in einen Exsiccator stellen, der im unteren Teil ungefähr die doppelte Menge konz. HCl p. a. enthält. Exsiccatordeckel paraffinieren. Die so gewonnene HCl ist spektralrein (sp. r.), sie wird mit quarzdest. Wasser auf etwa 10% eingestellt.

1%ige Eisenlösung: 1,0 g Carbonyleisen in 25 ml etwa 10%iger sp. r. HCl lösen (Quarzgefäß), mit quarzdestilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen. Daraus die erforderliche 0,1%ige Lösung herstellen.

Bezugslösung: 0,004% In(Ga, Pd): 2 ml 0,1%ige In(Ga, Pd)-Lösung und 1 ml sp. r. HCl mit quarzdestilliertem Wasser auf 50 ml. Verdünnung alle 4 Wochen erneuern. 0,1%ige In-Lösung = 0,071 g In_2S_3 in 1 ml sp. r. HCl lösen, auf 50 ml. (0,1% Ga = 0,0672 g Ga_2O_3 in 2 ml sp. r. HCl lösen, auf 50 ml. 0,1% Pd = 0,086 g Pd Cl_2 (58,14% Pd) und 1 ml sp. r. HCl auf 50 ml.)

Zusatzlösung: In Pt-Schale 20 g Glukose reinst, 4 g Glykokoll nach *Sörensen* und 4 g Harnstoff p. a. mit etwa 20 ml quarzdestilliertem Wasser befeuchten, auf dem Wasserbad eintrocknen und einige Stunden auf 100° C halten. Die Masse färbt sich unter lebhafter Gasentwicklung dunkelbraun und wird zähflüssig. Das Erhitzen fortsetzen, bis ein Gewichtsverlust von 10% eingetreten ist, die organische Substanz also noch 25,2 g wiegt.

* Blauband Schleicher und Schüll.

** Geliefert von den Vereinigten Aluminiumwerken, Erftwerk, Grevenbroich, Niederrhein.

Zu langes Erhitzen verringert die Haftfähigkeit. Den tiefbraunen Rückstand in 100 ml quarzdestilliertem Wasser lösen, wobei eine Volumenzunahme auf etwa 116 ml eintritt. Der Lösungsvorgang dauert einige Zeit. Mit 0,1 ml Chloroform haltbar machen.

Elektrodenlösung:

4 g NaCl p. a.;
4 g Zitronensäure p. a.;
1 g KCl p. a.;
0,1 g Ca = 10 ml 1% Ca (2,50 g $CaCO_3$ p. a. + 20 ml sp. r. HCl auf 100 ml);
3 ml 3-n H_3PO_4;

auf etwa 50 ml verdünnen, mit NH_3 p. a. auf p_H 7 bis 8 einstellen (etwa 6 ml 25%iges NH_3), durch Ausschütteln mit Dithizonlösung in CCl_4 bis zur bleibenden Grünfärbung reinigen. 0,02 g Mg = 2 ml 1%ige Mg-Lösung (8,82 g Mg-acetat 4 H_2O p. a. in 100 ml) und 10 ml gereinigte 1%ige Si-Lösung zugeben (10 g $Na_2SiO_3 8H_2O$ und 0,4 g NaOH auf 100 ml lösen. Davon 10 ml zur Reinigung mit 0,5 ml 1%iger Ca-Lösung teilweise fällen, Zentrifugat zur Elektrodenlösung zugeben), außerdem 20 ml sp. r. HCl, auf 100 auffüllen. Wie bei der Zusatzlösung 20 g Glukose usw. kondensieren, das Kondensationsprodukt aber nicht in Wasser, sondern in der eben beschriebenen Elektrolytlösung lösen.

„Reagens" A, 100 ml:

2 g Na-pyrrolidindithiocarbamat, Herstellung siehe[10];
100 ml quarzdestilliertes H_2O;
0,1 g Hydrazinsulfat p. a.;
1 ml Reagenz B (bei der 1. Herstellung nicht möglich);
1 ml 3-n H_3PO_4;
2 ml 1%ige Ca-Lösung;
Einige Tropfen Bromthymolblau;
Wenig NH_3, bis zum Umschlag;

Niederschlag abfiltrieren. In Kunststoffgefäß aufbewahren. Ein farbloser Niederschlag, der sich später bildet, ist ohne Bedeutung.

Reagens B, 100 ml (gebraucht wird die 3fache Menge von A):

3 g Anthranilsäure;
2 g 8-Hydroxychinolin (Oxin);
2 g Phthalsäure;
in 10 ml Eisessig unter Erwärmen lösen;
100 ml quarzdestilliertes Wasser zusetzen. Ein entstehender Niederschlag löst sich nachher mit NH_3 wieder auf.

Mit NH_3 p. a. auf p_H 4,8 einstellen (p_H-Papier, etwa 11 bis 12 ml 25%ige NH_3 erforderlich), wenn eine erneute Fällung eben beginnt, 2 ml Reagens A zusetzen. Über Nacht stehen lassen, durch Blauband-Filter in eine Kunststoffflasche filtrieren.

Teste, entsprechend 100 ml Blut:

Begleitstoffe: 20 mg Ca = 50 mg $CaCO_3$ p. a.
100 mg Na = 365 mg $NaHCO_3$ p. a.
40 mg K = 138 mg K_2CO_3
30 mg P = 1 ml 3%ige P-Lösung oder 3-n H_3PO_4
2 g Zitronensäure p. a.,

auf 20 ml auffüllen, mit NH_3 auf etwa p_H 8 einstellen, zur Reinigung mit Dithizon in CCl_4 ausschütteln bis die organische Phase nicht mehr rot wird.

In 30-ml-Quarzschalen folgende Analysenelementmengen geben:

Test:	0	I	II	III	IV
Pb μg	—	20	40	80	160
ml ...		0,2	0,4	0,8	1,6 ml 0,01% Pb-Lösung.

1%ige Pb-Lösung: 1,83 g Pb-acetat $3H_2O$ p. a. und 1 ml konz. HNO_3 auf 100 ml. Pb-Gehalt komplexometrisch nachprüfen.

Test:	0	I	II	III	IV
Cu, Zn μg	—	100	200	400	800
ml		0,10	0,2	0,4	0,8 ml 0,1% Cu, Zn-Lösung.

Außerdem: je 0,4 ml 0,1% In-, Ga-, Pd-Lösung (= je 400 μg)

1 ml 1%ige Fe-Lösung (= 10 mg Fe);
2 ml Lösung der Begleitstoffe;
2 mg Mg = 0,2 ml 1%ige Mg-Lösung (8,82 mg Mg-acetat. $4H_2O$ p. a. in 100 ml);

gut mischen, auf dem Wasserbad eintrocknen, bei 500° C glühen, die rotbraune Asche wiegen, mit Achatpistill zerreiben. In kleinen Präparatgläsern aufbewahren. Für die Analyse $^1/_{50}$ der Menge entsprechend 2 ml Blut direkt auf 2 Elektroden bringen.

Probemenge: 2 ml Vollblut, homogenisiert;
4 ml Serum;
10 ml Urin;
0,2 g Stuhl, Trockensubstanz bestimmen;
1 g Organ, Trockensubstanz bestimmen;
0,2 g Haare; 0,1 g Knochen.

Die Anreicherung des Bleis

Zu den flüssigen Proben in 10-ml-Quarz- oder -Platinschalen (Urin: 30-ml-Schalen):

0,2 mg Fe = 0,2 ml 0,1%ige Fe-Lösung (außer zu Vollblut);
8 μg In(Ga, Pd) = 0,20 ml 0,004%ige Bezugslösung.

Zu Urin außerdem 0,2 ml Zusatzlösung als organische Substanz. Trocknen, im Luftbad verkohlen, die oft voluminöse Kohle wiederholt zerreiben, im Muffelofen bei 500° C soweit wie möglich veraschen, etwa 30 Minuten. Mit Achatpistill zerreiben.

Zur Asche zuerst 0,5 ml Reagens A, dann 1,5 ml Reagens B geben. Mit hydrophobiertem 2-mm-Glasstab umrühren und von Schalenwand lösen. Mit quarzdestilliertem Wasser befeuchtetes, gereinigtes Filterchen auf Plexiglas-Filterstäbchen bringen (Pinzette mit Kunststoffspitzen), Reagens absaugen. Vakuum aufheben, Filter zum Rückstand geben. Zur Reinigung sp. r. HCl und quarzdestilliertes H_2O durch Filterstäbchen saugen. Rückstand und Schale bei 500° C glühen, etwa 20 Minuten. Die Anreicherung kann durch Wägen verfolgt werden.

Die Behandlung mit Reagens A + B, das Absaugen und Glühen so oft wiederholen, bis die Asche nicht mehr als 5 mg wiegt. Sie ist dann meist rotbraun durch das anwesende Eisen. Bei Vollblut und Serum genügen gewöhnlich 2 bis 3 Behandlungen mit Reagens, andere Proben, besonders Urin und Organe, müssen öfter ausgezogen und geglüht werden.

Feste Proben zuerst in Kohle verwandeln (Muffelofen bei 450° C), mit einem kleinen Achatpistill Kohle in der Schale zerreiben. Zu Kohle zugeben:

0,2 ml Zusatzlösung,

Fe und Bezugslösung wie zu Flüssigkeiten, trocknen, von neuem verkohlen, nochmals sorgfältig zerreiben, veraschen. Mit Reagens ausziehen und weiterbehandeln wie die flüssigen Proben.

Knochen* (100 g) zerkleinern, 15 Min. bei 500° C glühen, zerreiben, mit 1 ml sp. r. HCl, Fe und Bezugslösung eintrocknen (bleibt etwas feucht), mit Reagens ausziehen, Rückstand mit 0,1 ml 10%iger, mit Dithizon gereinigter $NaHCO_3$-Lösung befeuchten, trocknen, kurz bei 500° C glühen. Die Behandlung öfters wiederholen.

Die angereicherte Asche mit schräg geschnittenem Federkiel sammeln und je zur Hälfte auf 2 abgedrehte und mit etwa 10%iger warmer HNO_3 gereinigte 5-mm-Al-Elektroden bringen, mit einer Spur Alkohol aus einer Mikropipette befeuchten und 0,010 ml Elektrodenlösung zusetzen, durch Klopfen auf der ganzen Elektrodenoberfläche verteilen, bei 95° C trocknen.

Von den Testproben (I bis III oder II bis IV) eine Menge abwägen, die 2 ml Vollblut entspricht und 8 μg Bezugselement enthält, auf 2 Elektroden bringen und weiterbehandeln wie die Analysenproben.

Die Aufnahmebedingungen

Gegenelektrode: 5-mm-Aluminiumstäbchen, Stirnseite eben.
Elektrodenabstand: 2 mm.
Spektrograph: Q 24 mit Zwischenabbildung. Spalt 15 μ.
Drei-Stufen-Filter: 100% 50% (40%) 10% Durchlässigkeit.
Anregung: Wechselstrom-Abreißbogen mit Hochfrequenzzündung 220 Volt.
Bogen-Pause: 1 : 3. Frequenz: 2/sec.
Vorwiderstand: 10 Ohm.
Lockkabel[11], doppelseitig (mit nur einem Lockkabel wird der benachbarte Teil der Elektrodenoberfläche bevorzugt abgefunkt).
Aufnahmedauer: 15 Sekunden, kein Vorfunken.
Platte: Perutz Spektral blau hart.

* Bei Knochen, teilweise auch bei Harn und bei Organen, bilden sich im Verlauf der Anreicherung schwerlösliche Polyphosphate. Man löst sie, indem man die Asche nach dem Ausziehen mit Reagens mit $NaHCO_3$ behandelt und dann erst erneut glüht. Dieses Verfahren beschleunigt auch die Veraschung.

Die Auswertung

Linien: Pb I 4057,8 Å, Untergrund auf der langwelligen Seite. Bezugslinie In 3258 Å Untergrund auf der langwelligen Seite. Im Rechengerät nach *Kaiser* aus den Photometerwerten ΔY* feststellen. Schwärzungskurve gerade strecken**, Untergrund ausschalten. Bleilinie in Filterstufe 1, Indiumlinie in 0. Mit ΔY Eichlinie aufstellen oder Gerät direkt in Konzentrationen eichen und Teste nur als Kontrolle und Korrektur verwenden.

Herr *Kinzler*, Mechanikermeister, Stuttgart-Botnang, Aspenwaldstraße 45, stellte das Plexiglas-Filterstäbchen, den Stanzer und den Rührer her. Meinem Mitarbeiter, Herrn *Buck*, danke ich für zahlreiche Verbesserungsvorschläge und für die Ausführung von Versuchen.

Zusammenfassung

Blei läßt sich in biologischem Material auch mit einem mittleren Spektrographen bestimmen, wenn es in der Asche angereichert wird. Der größte Teil der Begleitstoffe wird aus der Asche mit einem Reagens extrahiert, das Blei und andere Schwermetalle ungelöst zurückläßt. Die angereicherte Asche wird zusammen mit einer Haftlösung auf Aluminiumelektroden eingetrocknet. 2 ml Blut genügen für eine Doppelbestimmung bei einem Bleigehalt von 20 μg in 100 ml.

Summary

If lead in biological material is accumulated in the ash, it may be determined by means of even an intermediate spectrograph. The greater part of accompanying substances is extracted from the ash with a reagent which leaves the lead and other heavy metals behind undissolved. The enriched ash together with a bonding solution is dried on aluminium electrodes. A duplicate determination can be carried out with 2 ml blood if the lead content is of the order of 20 μg per 100 ml.

Résumé

En chimie biologique on peut doser le plomb à l'aide d'un spectrographe «médium» après enrichissement des cendres. La majeure partie des autres éléments est éliminée par un réactif qui laisse le plomb et les autres métaux lourds. Les cendres enrichies sont séchées sur électrodes d'aluminium en même temps qu'une solution complexante. 2 ml de sang suffisent pour un double dosage à une concentration de 20 μg dans 100 ml.

Diskussion

H. *P. Schweda* (Wien): Ich möchte den Herrn Vortragenden fragen, wie diese Blutproben verascht wurden. Wir haben ja hier am Institut für gerichtliche Medizin auch viel mit Blei zu tun und haben ebenfalls Blutproben heran-

* $\Delta Y = \log I_{Pb}/I_{In}$

** Beide Linien entweder mit der Seideltransformation T oder mit der Transformation 0,5 S + 0,5 T. Maximaler Ausschlag auf einer von der Gelatine befreiten Stelle der Platte.

gezogen, die viel charakteristischere Bleiwerte geben als z. B. Spontanharne oder auch 24-Stunden-Harne. Jetzt veraschen wir die Blutproben bei 500 bis 550°, also bei kritischen Temperaturen, die schon seit *Jäger* bekannt sind, bekommen aber keine schönen Aschen. Diese sind vielmehr stark kohlenstoffhaltig. Daher wollte ich fragen, wie Sie blankgebrannte Rückstände von Blut erhalten.

H. *K. Pfeilsticker:* Namentlich bei Vollblut kann man die Veraschung bis zum Ende führen. Ich habe vorhin nicht erwähnt, daß wir die Veraschung der Kohle und das Ausziehen mit Reagens wiederholen. Das geschieht nicht nur ein einzigesmal, sondern die anfänglich kohlehaltige Substanz wird nochmals mit Reagens ausgezogen und neuerlich bei 500° in den Ofen gebracht.

H. *P. Schweda:* Also erfolgt eine wiederholte Behandlung dieser Aschenrückstände. — Dies stimmt mit unseren Erfahrungen überein, daß man mit einer einmaligen Veraschung auf gar keinen Fall zu blanken Rückständen kommt.

H. *K. Pfeilsticker:* Nein, hier bei Vollblut liegen die Verhältnisse besonders günstig, weil darin sehr viel Eisen enthalten ist, das die Veraschung fördert. Bei Vollblut ist es an und für sich gar keine besondere Kunst. Sie bekommen schließlich eine kleine Menge einer rotbraunen Asche.

H. *P. Schweda:* Und diese lösen Sie jetzt zum Auftragen auf Ihre Kohlen in Elektrodenmaterialien?

H. *K. Pfeilsticker:* Sie wird nicht gelöst, sondern in fester Form auf die 2 Elektroden gebracht. Es hat sich sehr bewährt, dies mit einem Federkiel (Zahnstocher) zu tun. Wir haben es früher mit einem kleinen Hornlöffel versucht. Ein solcher Löffel ist aber immer ziemlich dick und man kann ihn nicht nachschneiden. Die Zahnstocher-Federkiele sind hingegen dünn und hart und lassen sich gut zuschneiden. Die Menge der Asche ist so berechnet, daß sie auf zwei Elektroden gerade richtig verteilt werden kann.

H. *F. X. Mayer* (Wien): Wie teilen Sie das aber ein, daß Sie immer ungefähr die gleichen Mengen auf die beiden Elektroden bekommen?

H. *K. Pfeilsticker:* Das wird nach Augenmaß gemacht. Denn ob Sie 10% mehr oder weniger auftragen, macht für das ΔY_{Pb-In} nichts aus, vorausgesetzt daß man ein Bezugselement wählt, das sich dem Blei ähnlich verhält. Hätte ich z. B. ein Bezugselement wie Platin, dann dürfte ich das nicht tun, dann könnte es einen großen Fehler geben, aber wir haben schon seit Jahren darauf geachtet, stets Bezugselemente zu verwenden, die dem Analysenelement möglichst ähnlich sind.

H. *P. Schweda:* Es würde mich interessieren, welche untere Grenze an Blei Sie noch nachweisen können. Wie ich höre, gehen Sie von 2 ml Blut aus.

H. *K. Pfeilsticker:* 2 ml Blut für zwei Spektren, das gibt ungefähr 0,2 μg Pb/Elektrode.

H. *P. Schweda:* Und hierbei stört die Eisenunterlinie nicht? 0,2 μg können Sie also exakt ausmessen auf 5%. Bei Einzelauswertung kann man 7% annehmen: das ist eine enorme Genauigkeit, wie jeder Fachmann sofort feststellen wird.

H. *K. Pfeilsticker:* Bei 0,2 μg beginnt die darunter liegende Eisenlinie zu stören.

H. *P. Schweda:* Hier wäre also der Grenzwert.

H. *K. Pfeilsticker:* So etwa. Aber weil das den Normalwerten von Blei in Blut entspricht, macht das praktisch nichts aus.

H. *P. Schweda:* Die Frage der Normalwerte ist etwas zu kompliziert, um im Rahmen dieser Diskussion darauf einzugehen. Wir sind in dieser Hinsicht sehr skeptisch. Wie Sie wissen, werden 50 µg% von manchen als normal bezeichnet, von manchen nicht. Das ist aber nun hier ein kritischer Wert.

H. *K. Pfeilsticker:* Normalerweise sehen wir 20 bis 30 µg, allerhöchstens 40 µg Blei in 100 ml Vollblut.

H. *P. Schweda:* Sie werden sicherlich selbst wissen, daß die Amerikaner bei weitem größere Toleranzen haben.

H. *K. Pfeilsticker:* Auch in Deutschland gibt es Leute, die 60 µg noch als normal ansehen.

H. *F. X. Mayer:* Bitte, dies geht über den Rahmen dieser Diskussion. Unsere Auffassung ist, daß der normale Höchstwert ungefähr 30 µg Pb/100 ml beträgt.

H. *P. Schweda:* Sie haben auch Harn aufgearbeitet. Da ergibt sich das alte, leider viel zu wenig beachtete Problem, das wir in unserer Arbeit auch gestreift haben: anorganisches Blei, organisches Blei, Gesamtblei im Harn oder nur anorganisch gebundenes Blei? Da Sie die Harnproben direkt eindampfen, erhalten Sie also Gesamtbleiwerte. Haben Sie auch die Erfahrung gemacht, daß die Gesamtbleiwerte bedeutend höher liegen, als Bleiwerte nach Anreicherungs- oder Mitfällungsreaktionen?

H. *K. Pfeilsticker:* Ich erhalte in vielen Harnen niedrigere Werte, die also unter 100 µg/Liter liegen. Das halte ich für normal.

H. *F. X. Mayer:* Schon, das hängt aber von der Art der Aufarbeitung ab. Wenn Sie Harne zur Gänze veraschen, dann bestimmen Sie natürlich das gesamte Blei. Es gibt aber eine andere Bleibestimmung, bei der man das Blei anreichert, indem man z. B. eine Phosphatfällung macht, wobei das Blei mitgerissen wird. Man arbeitet diesen Schlamm auf und erhält eine deutliche Diskrepanz, weshalb wir der Ansicht sind, es gibt ein Gesamtblei und es gibt ein anorganisch gebundenes Blei.

H. *K. Pfeilsticker:* In dieser Richtung habe ich keine Erfahrung.

Literatur

[1] *Kettering*-Laboratorium, Experimentelle Forschungen über Bleiaufnahme und Bleiausscheidung. Berlin: J. Springer. 1939.

[2] *A. Danielsson*, Informationstagung über die Bleikrankheit am 12. 9. 1952. Heft 3 der Schriften der Gesellschaft Deutscher Metallhütten- und Bergleute, Clausthal-Zellerfeld 1952. S. 97.

[3] *V. Brustier, P. Cornec* und *H. Triche*, C. r. acad. sci., Paris **234**, 2367 (1952); Ref. Chem. Zbl. **1954**, 7018; Z. analyt. Chem. **139**, 366 (1953).

[4] *G. Schrader*, Z. Hygiene **131**, 636 (1950); Diss. Göttingen 1946.

[5] *K. Pfeilsticker*, Fiat-Bericht, Analyt. Chemistry **1946**. S. 92. Vortrag Marburg 1950; Ref. Angew. Chem. **62**, 411 (1950).

[6] *F. A. Pohl*, Z. analyt. Chem. **142**, 19 (1954).

[7] *O. Leuchs*, Spectrochim. Acta **4**, 237 (1950).

[8] *K. Pfeilsticker*, Spectrochim. Acta **4**, 100 (1950); Mikrochim. Acta [Wien] **1955**, 358; Ref. Angew. Chem. **66**, 758 (1954).

[9] *H. Kaiser*, Spectrochim. Acta **4**, 351 (1951).

[10] *G. Gleu* und *R. Schwab*, Angew. Chem. **62**, 320 (1950).

[11] *G. Balz*, Aluminium **26**, 60 (1944).

Instituto Geológico y Minero de España, Madrid

Valoración espectrografica de rubidio y estroncio en las micas

Por

Juan Manuel López de Azcona

Con 1 figura

(Recibido el 11 de mayo de 1955)

1° Preparación de la muestra

A la muestra de mica seleccionada, se le separan todas las partes que pueden haber estado en contacto con la atmósfera, corrientes acuosas o fenómenos que la alteran. La parte restante, se lava con agua destilada para desprender cualquier partícula de polvo o sustancia que tenga adherida. Efectuada esta primera limpieza, se porfiriza a 150 μ y trata con agua destilada, para eliminar cualquier impureza soluble en la misma. Se lava a continuación con ácido sulfúrico (4%) y deja secar.

La cantidad de 0,1 g de muestra limpia y seca se trata con ácido fluorhídrico (40%) y perclorico (70%) en la cantidad de 3 ml del primero y 1 ml del segundo. Se lleva a sequedad a una temperatura de 110°C y se repite la operación.

El residuo seco se mezcla intimamente con 0,1 g de cloruro amónica y se preparan electrodos comprimidos de 3 mm de diámetro sometidos a una fuerza total de 200 kg.

2° Condiciones de excitación

El espectrógrafo utilizado es un Qu 24, en el que se tiene que determinar el diafragma previo y el ancho de la rendija. Como las líneas que se utilizan para la valoración son las Rb I 4201,85 y Sr II 4077,71 teniamos un interés especial en eliminar toda influencia de fondo sin pérdida de sensibilidad y para ello comprobamos que las condiciones óptimas son, un diafragma previo de 1,2 mm y un ancho de rendija de 0,010 mm.

Se procuró dar a los electrodos unas dimensiones adecuadas, para que el consumo de grafito fuese el mínimo, las que se aprecian en la

figura. En el taladro practicado en el grafito entra perfectamente ajustado el comprimido, que previamente se cortó a 2 mm de espesor por medio de un patrón plástico transparente. Al tener invariables el diámetro y el espesor, el volumen de muestra consumida es siempre del mismo orden.

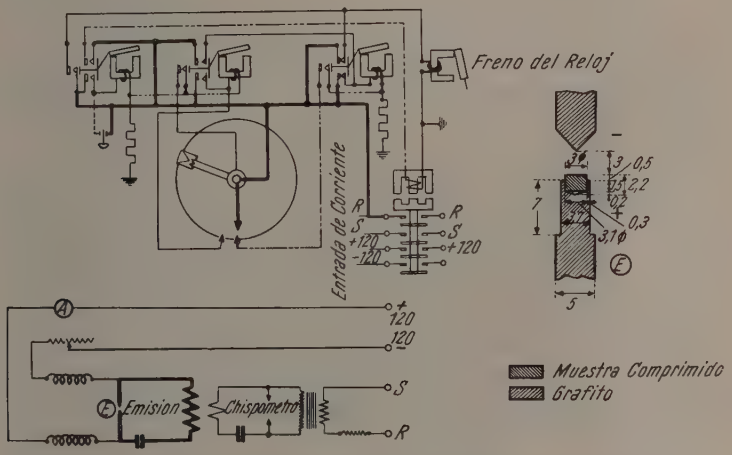


Fig. 1. Circuito automatico de excitación y electrodos para comprimidos

La excitación es por arco, con corriente continua a 240 V, y 5 A colocando el comprimido en el electrodo inferior, que es el positivo y dando una separación entre la muestra y electrodo superior de 3 mm. Con el fin de iniciar el arco y poderlo mantener, existe una excitación simultanea por alta frecuencia, que se puede apreciar en el adjunto esquema. Los dos circuitos de excitación son automáticos, con una duración en segundos del proceso de excitación, según programa fijado previamente en el reloj.

Se comprobó por desplazamiento de la emulsión fotógrafica, que en el rubidio se inicia la excitación al tercer segundo con un máximo del 6° al 9° cesando casi totalmente de emitir hacia el 12° y que en el estroncio, tambien se inicia la emisión en el 3° segundo con un máximo del 6° al 12° y que a partir del 25° segundo de excitación, la emision producidad por este elemento no tiene valor significativo, por ello se fijó en 25 segundos la duración total de la emisión.

3° Preparación de las escalas patron

En las únicas micas en que se pretende efectuar las valoraciones es en las muscovitas, por ello se preparó una mica artificial con la composición media de todos sus elementos, salvo el silicio.

Dichos elementos se pusieron al estado de cloruros, en los cuales se combrobó previamente la carencia de rubidio y estroncio. Se omitieron el calcio y el bario, por utilizar estos dos elementos como indice de contaminación de las muscovitas por estroncio común.

Las cantidades de cada uno fueron las necesarias, para que la muestra teórica, a la que supusimos se le habia añadido la silice necesaria, tuviese para cada uno de los elementos las siguientes proporciones;
Na — 0,8%, K — 6%, Mg — 0,3%, Mn — 0,2%, Fe — 0,04% y Al — 18%.

A la mezcla intima de los cloruros se les dió el mismo tratamiento que a las micas naturales con ácidos fluorhidrico y perclórico, pero una sola vez.

Analizamos esta mica sintética y a pesar de todas las precauciones que tomamos, dió un contenido de 0,01% de rubidio y de 0,0007% de estroncio. En su espectrograma tambien se aprecian claramente las líneas del calcio, de las cuales la Ca I 4226,73 es muy útil para la valoración mas precisa del rubidio y del estroncio.

Las escalas de rubidio y estroncio, se prepararon solamente entre los limites que son normales en las muscovitas de la Peninsula Ibérica, o sea para el Rb de 0,07 a 0,45% y de Sr de 0,001 a 0,015%. En ellas el valor máximo del estroncio es superior al correspondiente del rubidio, pero se adoptó dicho límite para poder valorar ambos elementos en los casos de contaminación de la muestra con estroncio común.

Las concentraciones por % de cada término son las siguientes;

Término	Rb	Sr
0	0,450	0,015
1	0,300	0,010
2	0,225	0,006
3	0,150	0,003
4	0,100	0,002
5	0,085	0,001
6	0,070	—

La corrección que se efectua por medio del calcio, consiste en suponer que el valor de las densidades de ennegrecimiento de las lineas del calcio son constantes, por permanecer invariable su concentración. Se toma como valor óptimo, la media geométrica de las que quedan despues de desechar los espectrogramas que presentan anomalias o que no tuvieron una emisión perfecta. La corrección que se introduce, es geométrica para la desviación de cada elemento. Como ejemplo, se dá la fectuada para el término 4° del rubidio.

Termino	I Rb	log I Rb	log I Rb corr.	media aritm.	dispersión	I Ca	log I Ca	Diferencia del medio
Rb 4	464	2,667	2,677		0,001	421	2,624	0,010
Rb 4	468	2,670	2,677	2,678	0,001	424	2,627	0,007
Rb 4	475	2,677	2,681		0,003	427	2,630	0,004
media del Ca						430	2,634	

Con esta corrección, se ha reducido la dispersión maxima en la escala, de 0,006 a 0,003 o sea que el error ha pasado del 1,4% al 0,7%.

Con las medidas de los valores rectificados, se trazaron las curvas que relacionan para el rubidio y para el estrocio los logaritmos de las concentraciones y de las intensidades.

4° Valoración Sr/Rb

Los espectrogramas de las micas, se obtienen cinco veces consecutivas y si existe alguna anomalia en la emisión o se aprecian diferencias imprevistas en el fotometrado, se desecha el espectrograma correspondiente. Con la media aritmética de los logaritmos de las desviaciones, se deducen sobre las curvas de calibración los logaritmos de las correspondientes concentraciones del Sr y Rb y sus diferencias dan el logaritmo del cociente.

En las valoraciones del estroncio y rubidio, no se efectuan correcciones por no ser necesarias, ya que el valor que interesa es el cociente de ambos, y por ello quedan compensadas las pequeñas diferencias debidas a las variaciones de la emisión.

Uno de los fines perseguidos en todo momento, es reducir al mínimo el consumo de muestra, el peso de cada comprimido es de 30 mg, pero como la mitad es cloruro amónico, corresponde a la mica preparada 15 mg, o sea a las 5 determinaciones 75 mg, por lo que se parte de 0.1 g de mica.

Como ejemplo de los resultados obtenidos, damos el correspondiente a unas chimeneas pegmatiticas de Sierra Albarrana (Cordoba). Para datar esta formación se disponia de unas uraninitas y unas muscovitas, estas contemporaneas de aquellas, o ligeramente anteriores, los valores deducidos fueron.

Edad de las uraninitas, por el método del plomo ~ 280 m. de a.

Edad de las muscovitas, por la relación Sr/Rb . . . 280 m. de a.

Como se vé ambos valores son totalmente concordantes, lo que demuestra la utilidad y precisión de la técnica descrita para la valoración de la relación Sr/Rb.

Resumen

Se persigue con este trabajo, la determinación de la relación Sr/Rb en las micas, con el empleo de la menor cantidad posible de mineral 0,1 g, con el fin de su datación por medio de la fórmula

$$t = 3{,}1 \times 10^{11} \times I_{Sr/Rb}.$$

Para calcular esta relación es necesario; I° Preparar y tratar la muestra para que esté en condiciones de porderla excitar. 2° Estudio de las condiciones de excitación con el fin de que la emisión sea la más adecuada para la reducción al mínimo de los errores. 3° Preparación de escalas patrón de rubidio y estroncio. 4° Técnica para determinar la valoración.

Zusammenfassung

Zum Zwecke der Altersbestimmung von Glimmer wird das Verhältnis Sr/Rb unter Verwendung kleinster Substanzmengen (0,1 g) spektralanalytisch ermittelt und mit Hilfe der Formel

$$t = 3{,}1 \times 10^{11} \times I_{Sr/Rb}$$

ausgewertet. Für die Bestimmung des Verhältnisses Sr/Rb ist notwendig: 1. Entsprechende Vorbereitung der Proben für die spektroskopische Bestimmung, 2. Ermittlung reproduzierbarer Anregungsbedingungen, 3. Aufstellung von Eichkurven für Rb und Sr, 4. Auswertung.

Summary

In order to determine the age of mica, the Sr/Rb ratio was determined spectrometrically using very small amounts (0,1 g) and evaluated with the aid of the expression

$$t = 3{,}1 \times 10^{11} \times I_{Sr/Rb}.$$

The determination of the Sr/Rb ratio requires: 1) suitable preparation of the samples for the spectroscopic determination, 2) discovery of reproducible excitation conditions, 3) construction of calibration curves for Rb and Sr, 4) interpretation.

Résumé

On calcule l'âge des micas à partir du rapport Sr/Rb déterminé spectrographiquement sur de petites quantités (0,1 g) à l'aide de la formule:

$$t = 3{,}1 \times 10^{11} \times I_{Sr/Rb}.$$

Pour déterminer le rapport Sr/Rb on doit: 1) préparer des échantillons en vue du dosage spectroscopique; 2) réaliser des conditions d'excitation reproductibles; 3) établir des courbes d'étalonnage pour Rb et Sr; 4) exploiter les résultats.

Discusión

H. *N. W. H. Addink* (Eindhoven): Ich möchte fragen, ob Sie die Konzentrationen von Rubidium und Strontium auch chemisch-analytisch kontrolliert haben.

H. *J. M. Lopéz de Azcona:* Nein, diese Konzentrationen sind so klein, daß dies zu schwierig wäre.

H. *N. W. H. Addink:* Es war aber zu sehen, daß die Verdampfung von Rb und Sr nicht gleichzeitig erfolgt.

H. *J. M. Lopéz de Azcona:* Zur Kontrolle haben wir Muskovit künstlich hergestellt, dem wir bekannte Mengen Rb und Sr zugesetzt haben. Die Bestimmung erfolgte dann in gleicher Weise und nach gleicher Vorbehandlung der Proben.

Bibliografia

[1] *L. H. Ahrens*, Bull. Geol. Soc. Amer. **60**, 217 (1949).
[2] *L. H. Ahrens* y *G. L. Gorinkle*, Amer. J. Science **249**, 451 (1951).
[3] *J. M. Lopéz de Azcona*, Bol. inst. geol. min. de España **63**, 257 (1951).
[4] *J. M. Lopéz de Azcona*, Notas y Comunicaciones **35**, 113 (1954).

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Universität Münster, Westfalen

Spektralanalytischer Spurennachweis nach Anreicherung durch innere Elektrolyse

Von

W. Seith† und W. Gremm

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 12. April 1955)

Die Spektralanalyse von Spuren mit vorheriger Anreicherung durch innere Elektrolyse haben wir bereits 1941 durchgeführt[1]. Es handelte sich damals um die Bestimmung von Bi, Pd, Pb, Sn und Tl in Feinzink und der Zinklegierung Zamak β. Die Verhältnisse lagen hierbei ziemlich einfach, denn alle Elemente, die bestimmt werden sollten, waren edler als Zink und ließen sich auf diesem gut abscheiden. Ferner war das Zink selbst nicht reich an Spektrallinien, sodaß diese nicht störten. Zamak β enthält zudem Cu in einer gerade geeigneten Menge, daß es als Bezugselement benutzt werden kann. Beim Feinzink wurden der Lösung einige mg Ni als Bezugselement zugesetzt.

Zur Analyse waren 0,5 bis 2 g Zn oder Legierung aufzulösen. In schwach salzsaurer Lösung erfolgte die Abscheidung auf runden Feinzinkstäben von 6 mm Durchmesser, die 6 cm tief in die Lösung getaucht waren, in 7 Stunden. Die Elektroden wurden in einer Drehelektrode schraubenförmig unter einer Al-Elektrode durchbewegt und mit einem durch Hochfrequenz gezündeten Wechselstrombogen abgetastet. Der Analysenbereich betrug bei allen Elementen 0,01 bis 0,0001%. Die mittleren Fehler lagen bei $\pm$ 5 bis 10%.

Heute soll nun über die Bestimmung von Pb in Fe berichtet werden, wo es meist in geringen Mengen vorhanden ist. Die naßchemische Analyse ist sehr zeitraubend und bedarf großer Einwaagen. Hier liegen die Verhältnisse für die Spektralanalyse etwas anders als beim obigen Beispiel. Eisen ist linienreich und eignet sich nicht als Unterlage für die Abscheidung. Pb ist zwar edler als Fe, aber dies trifft auch noch

bei einigen anderen Elementen zu, die im Fe in viel höherer Konzentration vorliegen. Die Spannungsreihe sieht folgendermaßen aus:

Fe/Fe^{2+} −0,44 V	Ni/Ni^{2+} −0,23 V
Cd/Cd^{2+} −0,40 V	Mo/Mo^{2+} −0,2 V
Co/Co^{2+} −0,27 V	Pb/Pb^{2+} −0,126 V

Nach einer Reihe von Vorversuchen haben wir uns entschlossen, Cd als Grundmetall zu verwenden. Es ist nicht linienreich, ergibt gute Niederschläge und das in der Lösung vorhandene Fe stört auch in großen Konzentrationen nicht. Sonderbarerweise wurden auch Co und Ni nie im Niederschlag beobachtet. Dies ist wichtig, denn gerade sie hätten durch ihren Linienreichtum stören können. Dem einzigen Nachteil, der Giftigkeit der Cd-Dämpfe, wird durch ausreichenden Abzug begegnet. Die wesentlichen Arbeiten waren rein empirischer Natur und dienten zur Festlegung geeigneter Bedingungen, um gleichmäßige, festhaftende Niederschläge zu erhalten. Im allgemeinen wurde von 1 g Einwaage ausgegangen, worin bis zu 0,1% Pb enthalten war. Zunächst wurde in 10 ml Salzsäure 1 : 1 gelöst, ein eventueller Rückstand abfiltriert, aufgeschlossen und nach Auflösung beigefügt. Es hatte sich schon früher als unerläßlich erwiesen, der Lösung Ammoniumchlorid, Na-Acetat, Hydroxylamin und Gelatine zuzusetzen. Nach einigen Reihenversuchen hat sich folgende Zusatzlösung zur Erzielung einwandfreier Niederschläge als günstig erwiesen: 135 g Ammoniumchlorid, 250 g Natriumacetat, 7 g Hydroxylaminchlorhydrat, 3 g Gelatine auf 500 ml Lösung. 20 ml der Analysenlösung wurden mit 15 ml dieser Zusatzlösung versetzt.

Als Vergleichselement hat sich Sn bewährt. Es wurde jeder Analyse in einer Menge von 0,5 mg als Lösung zugesetzt. Bei der Zementation, die wie früher in Glasgefäßen mit CO_2-Rührung vorgenommen wurde, wurde das Sn mit dem Pb gleichmäßig abgeschieden. Außerdem war stets Cu im Niederschlag, das jedoch nicht stört, wenn die Fe-Probe nicht mehr als 0,1% davon enthält.

Die Cd-Stäbe, 5 mm Durchmesser, 80 mm lang, waren aus reinstem Material, das selbst weniger als 0,05% Pb enthielt, durch Gießen hergestellt und in Salpetersäure abgeätzt. Die Zementation dauerte 3 Stunden.

Zur Aufnahme haben wir den Hochspannungsfunken eines Feußner-Funkenerzeugers und die beschriebene Drehelektrode mit einer spitzen Kohle als Gegenelektrode verwendet.

Aufnahmebedingungen

Spektrograph: Fuess 110 M;
Spaltbreite: 0,03 mm;
Objektivblende: offen;
Zwischenabbildung;

Belichtung: 20 sek;
10 Umdrehungen;
Gegenelektrode: Kohle, Ringsdorff 10;
Herzog-Spektralplatte, blau;
Entwickler: Kodak D 19, 8 Minuten bei 18° C.

Als Analysenlinien dienten:

bei 0,1 — 0,003% Pb	Pb 2823,19 gegen Sn 2873,58
bei 0,03 — 0,0001% Pb	Pb 2833,07 gegen Sn 2813,58

Eichkurven wurden mit Hilfe des *Seidel*schen Schwärzungswertes aufgestellt. Im ersten Bereich läßt sich eine Eichkurve mit einer Transformationskonstanten 1, im zweiten mit 2 hinreichend geradlinig darstellen (Abb. 1 und 2). Wollte man noch kleinere Pb-Gehalte (unter 0,0001%) erfassen, so müßte man den Bleigehalt der Cd-Elektroden herabsetzen. Selbstverständlich waren alle verwendeten Reagenzien von allen störenden Pb-Mengen befreit und in Kunststoffflaschen aufbewahrt. Das gewöhnliche Glas enthält schon so viel Pb, daß die Reagenzien nach kurzer Zeit darin unbrauchbar wurden. Zu erwähnen ist noch, daß zur Zementation auch Fe-Stäbe verwendet werden können, die elektrolytisch mit Cd überzogen sind, wodurch der Verbrauch an Cd herabgesetzt wird.

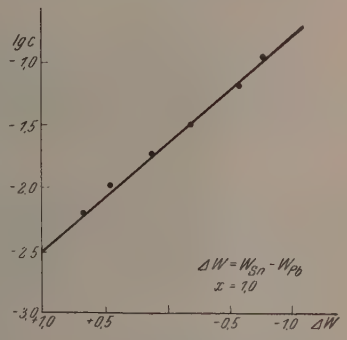


Abb. 1. Eichkurve mit Transformationskonstante 1

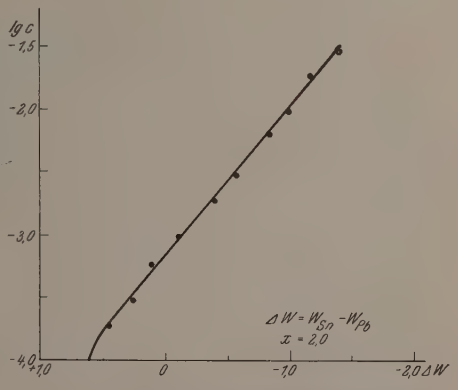


Abb. 2. Eichkurve mit Transformationskonstante 2

Der mittlere Fehler beträgt bei einem Pb-Gehalt von 0,001% etwa ± 9% des Analysenwertes.

Die Methode ist demnach für die Analyse von Fe auf Pb in solchen Gebieten geeignet, in denen man ohne Anreicherung nicht mehr spektralanalytisch arbeiten kann (0,001 bis 0,0001%). Bei höheren Pb-Gehalten (bis 0,1%) kann sie bei der Kontrolle von Eichlegierungen wertvolle Dienste leisten.

Zur Ausführung einer einzelnen Analyse benötigt man 5 Stunden; bei Serien liegt die benötigte Zeit wesentlich günstiger.

Zusammenfassung

Zum quantitativen spektralanalytischen Nachweis von Blei in Eisen bis zu 0,0001% wurde eine Methode ausgearbeitet, bei der das Blei durch innere Elektrolyse auf Cadmium abgeschieden wird. Als Bezugselement wird Zinn verwendet. Zum Abfunken dient eine Drehelektrode. Der mittlere Fehler liegt bei $\pm$ 9% des Analysenwertes.

Summary

A method has been worked out for the quantitative spectral analytical detection of lead in which the lead is deposited on cadmium by internal electrolysis. Tin is used as reference element. A rotating electrode serves for sparking off. The mean error lies at $\pm$ 9% of the analytical value.

Résumé

On a mis au point une méthode pour le dosage spectrographique du plomb dans le fer jusqu'à 0,0001%; le plomb est séparé par électrolyse interne sur électrode de cadmium. On utilise l'étain comme étalon interne. On produit l'étincelle sur une électrode tournante. La précision moyenne est $\pm$ 9%.

Diskussion

H. *F. X. Mayer* (Wien): Wie lange ist das Stück der Elektrode, das eingetaucht wurde?

H. *H. de Laffolie:* Die ganze Länge der Elektroden beträgt 8 cm. Etwas über die Hälfte, also ungefähr 4 cm, wurden eingetaucht.

H. *F. X. Mayer:* Haben Sie einmal überschlagen, wieviel von der ganzen Fläche abgebrannt wird? Doch wohl kaum alles.

H. *H. de Laffolie:* Nein. Wir waren damit zufrieden, daß der Funken nur an einzelnen Stellen überging und wir ein gutes Spektrum erreichten. Das was man sehen wollte, war da. Ich nehme an, daß mindestens etwa die Hälfte des elektrolytisch aufgebrachten Materials dann auch wieder verdampft wurde.

Literatur

[1] *W. Seith* und *J. Herrmann*, Spectrochim. Acta **1**, 548 (1941).

Aus dem Institut für Mineralogie, Technische Hochschule München

Zur Spektralanalyse von Siliciumcarbid

Von

Franz Rost

Mit 9 Abbildungen

(Eingelangt am 13. April 1955)

Die Eigenschaften des technisch wichtigsten Schleifmittels Siliciumcarbid oder Carborund hängen in entscheidendem Maße von den Herstellungsbedingungen ab. Verunreinigungen, wie Eisen, Aluminium und Titan, daneben Magnesium und Calcium, die mit den Ausgangsmaterialien Quarz und Kohlenstoff verschiedener Herkunft und Reinheit in den Produktionsgang gebracht werden, spielen eine Rolle. Diese Verunreinigungen beeinflussen nicht nur rein äußerlich die Färbung — das am meisten geschätzte Material von hellgrüner Färbung zeichnet sich durch besondere Reinheit aus —, sondern auch Gitterbau[3] und damit wesentliche Festigkeitseigenschaften des Siliciumcarbids. *F. Müller* und *Tor Sunde*[5] halten neben dem Eisen vor allem das Aluminium für eine Gütemindерung des SiC für verantwortlich.

Die analytische Erfassung der genannten Elemente sowohl in den Ausgangsmaterialien wie im Fertigprodukt Siliciumcarbid selbst stellt daher eine wichtige, den Wissenschaftler und Techniker interessierende Aufgabe dar, deren Lösung chemisch und spektralanalytisch möglich ist.

Die chemische Bestimmung der genannten außerordentlich verbreiteten „Spurenelemente" im SiC führt bei erschwerten Aufschlußmöglichkeiten infolge der zu berücksichtigenden geringen Gehalte von Zehntel- bis Hundertstelprozent oft zu ungenauen Werten, da eine Einschleppung dieser Verunreinigungen in den Analysengang schwer vermeidbar ist. Die notwendige laufende Reinheitsüberprüfung der verwendeten Chemikalien ist aus denselben Gründen ebenfalls schwierig und zeitraubend. Die Gefahr der Einschleppung kann jedoch bei Wegfall jeglicher chemischer Behandlung durch Anwendung eines spektrographischen Analysenverfahrens vermieden werden, das für die Bestim-

mung der Verunreinigungen in Siliciumcarbid besonders geeignet erscheint. In vorliegender Arbeit wurde daher versucht, einen Beitrag für die Grundlagen eines spektrographischen Analysenverfahrens für SiC zu liefern.

Apparatur und Methodik

Spektrograph: Q 24 Carl Zeiss.

Optische Anordnung: Zwischenabbildung: Dreistufenfilter mit 4, 20 und 100% Durchlässigkeit auf Spaltlinse des Q 24; Spektrographenspaltbreite: 0,05 mm.

Bogen: Bogenstativ von H. Albrecht, Göttingen: Elektroden: Spektralkohlen der Firma Ruhstrat, Göttingen, Abmessungen: 1.3 2—5 mm; Gegenelektrode: 5 mm Durchmesser, plangeschliffen: Elektrodenabstand: 2,5 mm; Stromstärke: 6 Amp.; Netzspannung: 220 Volt Wechselstrom 50 Hz.

Platten und Entwicklung: Perutz-Reproduktionsplatte hart; Metol-Hydrochinon-Entwicklung bei 18° und 4 min.

Auswertung: Fuess Vertikal-Photometer.

Analysenlinien:

Si 2987,7
Fe 3020,6
Al 3082,2
Ti II 3234,5
Mg II 2802,7
Ca 3933,7

Grundlagen der Bestimmungsmethode

Bei der quantitativen spektrographischen Bestimmung von Verunreinigungen in SiC tritt das Problem geeigneter Eichmischungen in den Vordergrund, da dem SiC spektral gleichwertige Eichsubstanzen — wie etwa SiC mit bekannten Gehalten — nicht oder nur mit größtem experimentellem Aufwand darzustellen sind. Die Heranziehung chemisch analysierter SiC-Proben liefert aus den in der Einleitung gestreiften Gründen keine sicheren Ausgangswerte.

Durch nachträgliche Zumischung der Bestimmungselemente — beispielsweise in Oxydform — zu einem möglichst reinen SiC ist zunächst eine Möglichkeit gegeben, Eichmischungen und Eichkurven zu erhalten. Wenn damit auch die Voraussetzungen völliger spektraler Gleichwertigkeit nicht erfüllt sind, zeigen doch die Intensität/Zeit-Diagramme für SiC mit und ohne Zumischung gleichartigen Kurvenverlauf für das Grundelement Si und die Zusatzelemente (Abb. 1 und 2).

Bei den kleinen zu bestimmenden Gehalten ergibt sich die Not-

wendigkeit, die auch im reinsten SiC als Grundsubstanz der Eichmischungen vorhandenen Verunreinigungen berücksichtigen zu müssen, was nach *A. Gatterer*[1] nur dann mit genügender Genauigkeit erfolgen kann.

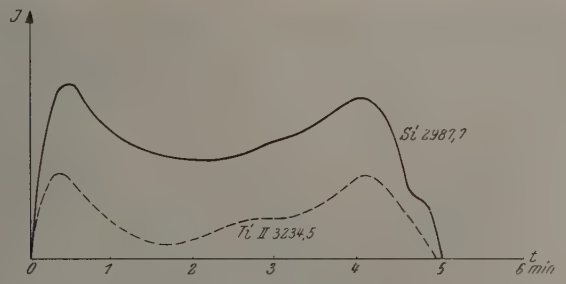


Abb. 1. I/t-Diagramm für die Eichmischung 0,1% TiO_2 in SiC

wenn man im geradlinigen Teil der Schwärzungskurve mißt. Dies ist hier erfahrungsgemäß nicht immer der Fall.

Auf der anderen Seite scheint eine quantitative Bestimmung — auch bei Fehlen spektraler Gleichwertigkeit — über Eichkurven möglich.

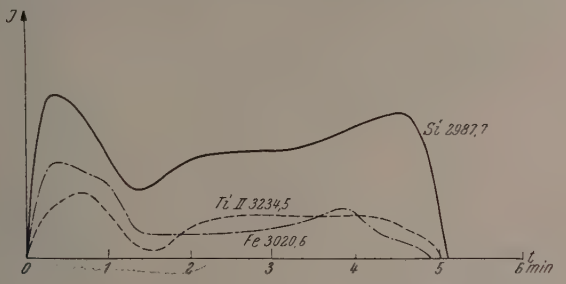


Abb. 2. I/t-Diagramm für SiC (mit etwa gleichem TiO_2-Gehalt)

die mit SiO_2 als Grundsubstanz aufgestellt werden können. SiO_2 ist als Bergkristall genügend rein — die Verunreinigungen betragen 10^{-4}% und weniger.

Bei der Ableuchtung von Mischungen mit vorwiegend Quarz bildet sich in der Temperaturzone der Lochelektrode zwischen 1900° und 2200° aus SiO_2 und dem anwesenden Kohlenstoff (der üblichen Spektralkohlebeimischung sowie der Elektrodenwandung) intermediär in beträchtlicher Menge SiC, wie röntgenographisch nachgewiesen werden kann (Abb. 3). Ähnliche chemische Reaktionen in der Lochkohle und ihre Bedeutung für die Spektralanalyse beschrieb *O. Leuchs*[4].

Trotzdem ergeben die I/t-Diagramme nur für gleichsiedende Elemente bzw. Verbindungen, wie etwa des Fe und Al, einen befriedigenden Kurvenverlauf. Das Ti zeigt dagegen aus SiO_2 als Basis erst gegen Ende der

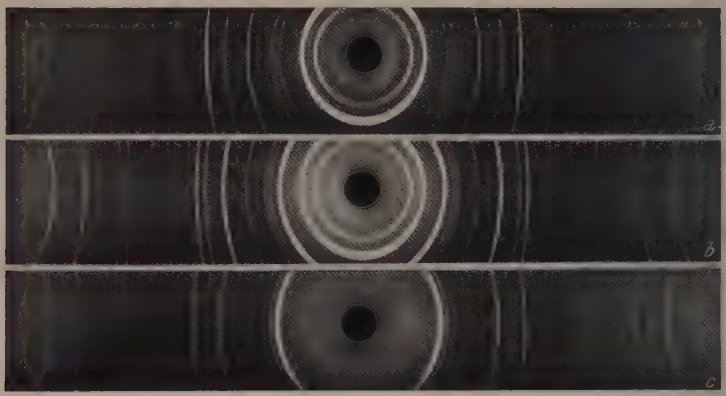


Abb. 3. Debye-Scherrer-Diagramme von SiO_2 (*a*), SiC (*c*) und einer SiO_2C-Kohlefüllung nach 5 sek Bogenbrand (*b*)[2]

Ableuchtung das Hauptmaximum der Verdampfung und Anregung, dessen quantitative Erfassung eine längere Belichtungszeit von 5 Minuten notwendig macht (Abb. 4).

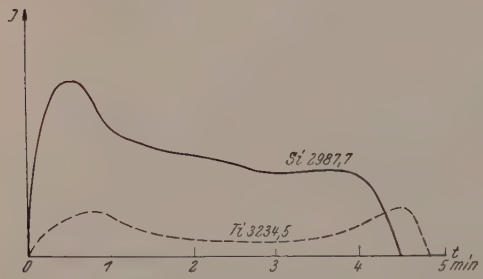


Abb. 4. I/t-Diagramm für die Eichmischung 0,1% TiO_2 in Quarz

Die Eichkurven

Die Eichkurven ergaben sich durch photometrische Auswertung von Aufnahmen der Eichmischungen mit SiC einerseits und SiO_2 andererseits als Grundsubstanzen. Zugemischt sind in beiden Fällen jeweils die Oxyde von Fe, Al, Ti und Mg. Für Eisen, Titan und Magnesium ergab sich ein paralleler Verlauf der Eichkurven (Abb. 5, 7 und 8). Dies ist theoretisch zu erwarten, da der Si-Gehalt im SiC 1,54mal höher liegt als in Quarz und die auf Si als Grundelement bezogenen ΔY-Werte bei den SiC-Kurven niedriger liegen müssen. Je nach der Neigung der „Eichgeraden" beträgt diese Differenz bei gleichen Gehalten der Zusatzelemente für ΔY 0,12 bei Mg und 0,14 bei Ti.

Der Differenzwert beider Kurven beträgt für Fe nur 0,7, was auf eine verschiedene Ableuchtung des Fe aus SiC und SiO_2 zurückgeführt werden muß. Für Al (Abb. 6) konnte nur eine Kurve für die Bestimmung in SiO_2 erhalten werden, da die Al-Kurve für SiC als Grundsubstanz keine parallele Lage zur SiC-Kurve hatte, sondern wesentlich flacher verlief. Dieses Verhalten muß ebenfalls durch Ableuchtungsunterschiede gedeutet werden. Theoretisch müßte die SiC-Kurve parallel zur SiO_2-Kurve verlaufen. Sie wurde für Abb. 6 berechnet und eingezeichnet.

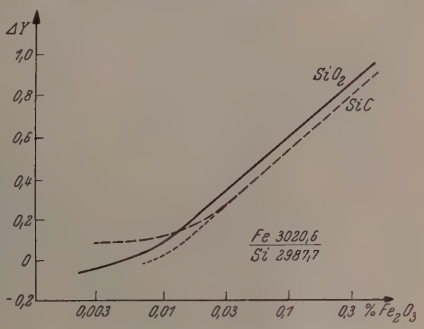


Abb. 5. Eichkurve für die Bestimmung von Fe

Es erscheint danach nicht berechtigt, vorliegende Eichkurven für eine exakte *absolute* Gehaltsbestimmung von verunreinigenden Elementen in SiC heranzuziehen, da eine gleiche Ableuchtung von in SiC enthaltenen und zugemischten Fremdelementen nicht immer erwiesen

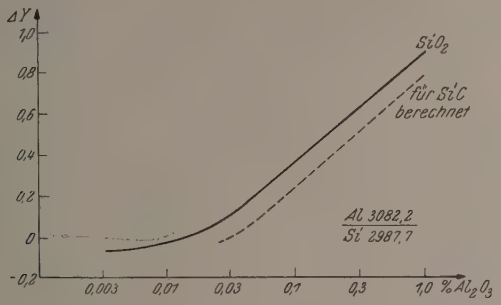


Abb. 6. Eichkurve für die Bestimmung von Al

ist. Trotzdem kann der Schluß gezogen werden, daß die Erfassung zumindest größenordnungsmäßig durchzuführen und nach ähnlicher Kurvenneigung und ähnlichem Kurvenverlauf eine *relative* Gehaltsbestimmung mit genügender Genauigkeit erfolgversprechend ist. Diese Folgerung wird auch durch den mittleren Analysenfehler gestützt, der aus zahlreichen Aufnahmen einer SiC-Probe berechnet wurde und der nur in erträglichen Grenzen vom mittleren Fehler der Gehaltsbestimmungen in SiC und SiO_2 bei nachträglicher Zumischung abweicht (Tabelle 1).

Analysenergebnisse

Die nach dem angegebenen einfachen Verfahren spektralanalytisch untersuchten Siliciumcarbidproben wurden in einem Diamantmörser

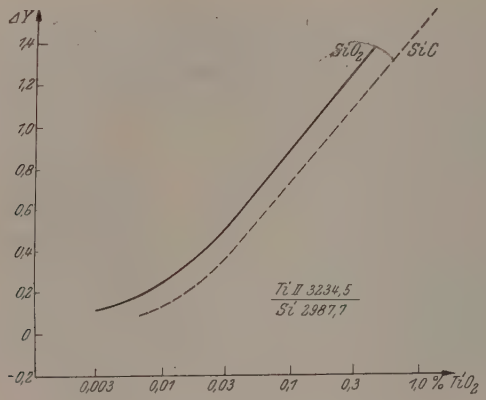


Abb. 7. Eichkurve für die Bestimmung von Ti

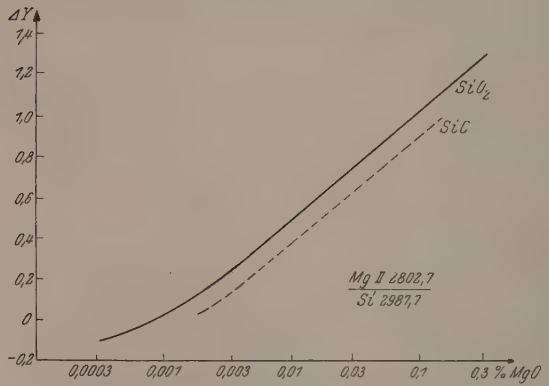


Abb. 8. Eichkurve für die Bestimmung von Mg

zerkleinert, von dem dadurch eingebrachten Eisen durch kurzes Kochen in verdünnter Salzsäure gereinigt und unter 0,055 mm Korngröße abgesiebt. Die feine Fraktion wurde zur Analyse verwendet.

Durchwegs ergab sich, daß Magnesium und Calcium in keinem Zusammenhang mit Aussehen und Eigenschaften des SiC stehen. Vor allem für Mg konnten nur wesentlich niedrigere Gehalte als nach chemischen Analysen nachgewiesen werden.

Eisen und Titan zeigen in den analysierten SiC-Proben (Produktion

1944 des Elektroschmelzwerkes Kempten) einen annähernd gleichartigen Gehaltsgang, wobei die relativ reinen hellgrünen Sorten unter 0,03% liegende Fe-Gehalte haben. Der Ti-Gehalt schwankt hier zwischen 0,003 und 0,07%, liegt also durchwegs unter 0,1% TiO_2. In den dunklen Sorten steigt meist der Gehalt an Fe und Ti über 0,1% an und kann bis 1% erreichen.

Tabelle 1. Mittlerer Fehler der Gehaltsbestimmung

	% SiC	% SiO_2
Fe	±15,8	±14,0
Al	±15,4	±11,7
Ti	± 7,1	± 8,2
Mg	±11,1	±13,3

Am aufschlußreichsten ist der Zusammenhang der durch Färbung äußerlich gekennzeichneten Eigenschaften des Siliciumcarbids mit dem Al-Gehalt, was die Überle-

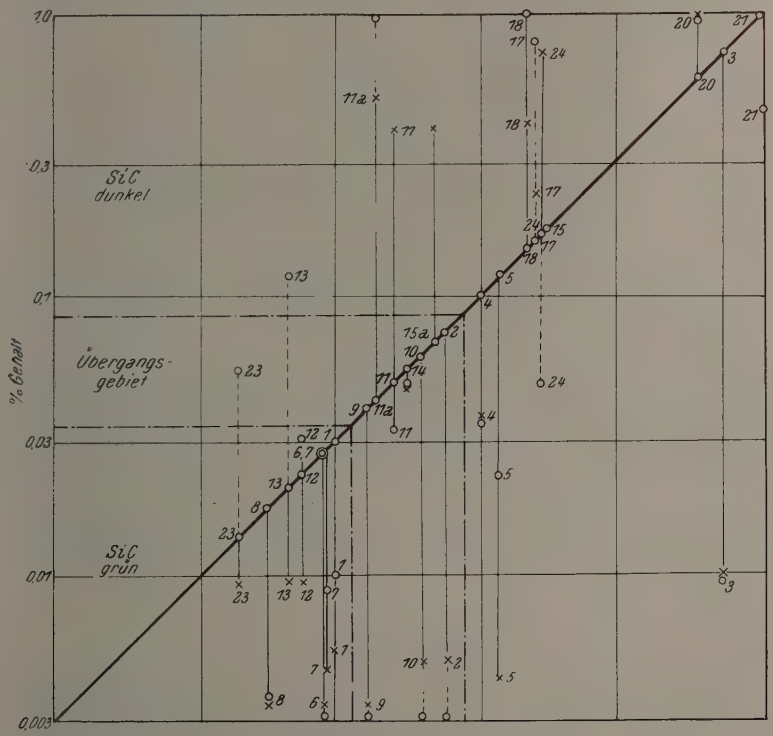


Abb. 9. Analysenergebnisse von SiC-Proben.
Auf der 45°-Geraden sind die Al-Werte eingetragen; Fe-Werte (x) und Ti-Werte (o) außerhalb dieser Geraden durch vertikale Striche für die jeweilige Probe miteinander verbunden

gungen von *F. Müller* und *Tor Sunde*[5] bestätigt. Im allgemeinen zeigen

die hellgrünen SiC-Proben einen unter 0,03% liegenden Al_2O_3-Gehalt (bei gleichfalls durchschnittlich unter diesem Wert liegenden Eisengehalten). In Abb. 9 sind die Al_2O_3-Gehalte auf der Ordinate in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Legt man die zugehörigen SiC-Proben auf eine (unter 45° verlaufende) beliebige Gerade, so zeigt die hier gewählte Darstellungsart deutlich die genannte Abhängigkeit der „hellen" und „dunklen" Sorten vom Al-Wert.

Im Übergangsgebiet sind zwei Proben herauszuheben, die trotz höherem Al-Gehalt nach ihrer Grünfärbung zu den „guten" Sorten gerechnet werden müssen. Probe 2 hat einen ausgesprochen niedrigen Fe- und Ti-Gehalt, ebenso Probe 14. Das bedeutet, daß neben der Höhe des Al-Gehaltes auch Fe und Ti für die Eigenschaften des Siliciumcarbids maßgebend werden können. Probe 11 erweist dies deutlich, da hier bei relativ geringen Al-Gehalten sehr hohe Fe- und Ti-Werte eine dunkle Färbung verursachen. Auch Probe 13 fällt in das Übergangsgebiet, deren blaugrüne Färbung auf einen hier ungewöhnlich hohen Ti-Gehalt von über 0,1% TiO_2 zurückgeführt werden kann. Die aus den vorliegenden Analysenergebnissen zu ziehenden Schlußfolgerungen werden auch durch die Werte norwegischer Proben aus Arendal bestätigt, die bei hellgrüner Färbung nach ihrem Al-Gehalt in das Übergangsgebiet fallen müßten, jedoch nur geringe Spuren an Fe und Ti enthalten (Nr. 9 und 10 in Abb. 9).

Vergleich mit chemischen Analysen

In der Einleitung wurden bereits die Schwierigkeiten einer chemischen Bestimmung der Verunreinigungen in Siliciumcarbid erwähnt, die die Ergebnisse unter Umständen zweifelhaft erscheinen lassen müssen. Diese Bedenken werden durch eine Gegenüberstellung der Analysendaten nach beiden Verfahren bestätigt, die vor allem im Eisengehalt beträchtlich voneinander abweichen können. Hier sind die *relativen* Differenzen am größten und dürften auf die Möglichkeit einer Einschleppung in den chemischen Analysengang zurückzuführen sein. Im allgemeinen bestätigen jedoch die chemischen Analysenwerte die Aussage über die größenordnungsmäßig richtige Bestimmung nach dem spektrographischen Verfahren, dessen relative Genauigkeit als besser angesehen werden muß.

Zusammenfassung

Aus der Diskussion der Grundlagen einer spektrographischen Siliciumcarbidanalyse und deren Ergebnissen folgt die Überlegenheit gegenüber der chemischen Analyse bei der relativen Gehaltsbestimmung verunreinigender Fremdelemente (Al, Fe, Ti und Mg), die bei einfacher Methode mit einem mittleren Fehler von 7 bis 15% durchgeführt werden kann. Die absolute Gehaltsangabe ist größenordnungsmäßig möglich.

Tabelle 2. Vergleichsanalysen von Siliciumcarbid
(*a* chemisch, *b* spektralanalytisch)

Probe-Nr.		Al_2O_3	Fe_2O_3	TiO_2
1	*a*	0,05	0,17	0,05
	b	0,03	0,005	0,01
2	*a*	0,04	0,21	0,04
	b	0,075	0,005	0,00
136	*a*	0,093	0,13	0,055
	b	0,10	0,02	0,042
142	*a*	0,11	0,15	0,094
	b	0,13	0,08	0,05
130	*a*	1,5		—
	b	0,47	1,0	0,06
3	*a*	0,11	0,15	0,05
	b	0,50	0,01	0,01
240	*a*	0,17	0,35	0,11
	b	0,75	0,005	0,055
127	*a*	1,5		—
	b	0,80	1,0	0,80

Die Analysenergebnisse an zahlreichen SiC-Proben zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Eigenschaften vom Al-Gehalt, die durch extrem hohe bzw. niedrige Werte von Fe und Ti beeinflußt werden kann.

Summary

The discussion of the fundamentals of a spectrographic analysis of silicon carbide and their results shows its superiority as compared with chemical analysis in the relative determination of the content of contaminating foreign elements (Al, Fe, Ti, Mg). This analysis can be conducted by a simple method with a mean error of 7 to 15%. It is possible to state the absolute content in order of size.

The analytical results in many samp'es of SiC show a distinct dependence of the properties on the Al-content, which may be influenced by extremely high or low values of iron and titanium.

Résumé

De la discussion des principes de base d'une méthode d'analyse spectrographique de carbure de silicium résultel a supériorité de cette méthode par rapport à l'analyse chimique pour le dosage relatif des éléments étrangers (Al, Fe, Ti, Mg); ils sont dosés par une méthode simple avec une précision moyenne de 7 à 15%. On peut aussi déterminer la valeur absolue de leur concentration, au moins en ordre de grandeur.

Les résultats d'analyse de nombreux échantillons de SiC révèlent une influence nette, sur leurs propriétés, de la concentration en Al qui peut être modifiée par de très fortes (ou de très faibles) teneurs en fer ou titane.

Diskussion

H. *Th. Heczko* (Linz): Haben Sie auch Silitheizstäbe nach dieser Methode untersucht?

H. *F. Rost:* Nein, ich habe zunächst einmal nur aus der Fabrikation des Elektroschmelzwerkes Kempten stammende Proben untersucht.

H. *Th. Heczko:* Es sind lange nicht alle Siliciumheizstäbe gleich. Es wäre daher interessant, Unterschiede in deren chemischer Zusammensetzung feststellen zu können.

H. *F. A. Pohl* (Belecke): Ich möchte fragen, ob Sie bei diesen Analysen auch auf Bor geprüft haben.

H. *F. Rost:* Nein, ich habe nicht auf Bor geprüft.

H. *F. A. Pohl:* Es ist nämlich anzunehmen, daß, wenn Aluminium Gitterstörungen verursacht, die diesen Effekt des schwarzen Siliciumcarbids zeigen, Bor einen ähnlichen oder gleichen Effekt geben dürfte. Und es gibt kaum ein Silicium oder irgendeine Siliciumverbindung, die frei von Bor wäre.

H. *F. Rost:* Daß der Borgehalt maßgebend ist, hat *Lely* in Eindhoven bereits festgestellt. Die Arbeit ist kürzlich in dem Syposium über moderne Probleme der anorganischen Chemie erschienen. Er sagt, hauptsächlich kämen hier die Elemente der 3. und 5. Gruppe in Frage.

H. *F. A. Pohl:* Von allen Elementen der 3. Gruppe ist wohl das Bor am meisten mit Silicium vergesellschaftet.

H. *F. Rost:* Bestimmt würde es stören können.

H. *G. Holdt* (Stuttgart): Sind die Fahrspektrogramme, die Sie zeigen, gemittelte Fahrspektrogramme?

H. *F. Rost:* Jawohl, mehrere.

H. *G. Holdt:* Haben Sie eine größere Streuung gefunden? Sie zeigten z. B. ein Spektrogramm, in dem Titan nachher einen charakteristischen Anstieg zeigt. Tritt dieser immer auf?

H. *F. Rost:* Aus Quarz, ja, das ist keine Zufallsaufnahme.

H. *G. Holdt:* Diesen von Ihnen gezeigten Verlauf findet man immer wieder?

H. *F. Rost:* Jawohl, in der Mitteilung aus mehreren Aufnahmen dürfte sich keine grundsätzliche Änderung ergeben.

H. *N. W. H. Addink* (Eindhoven): Haben Sie vielleicht ein Muster des National Bureau of Standards analysiert?

H. *F. Rost:* Von Siliciumcarbid nicht.

H. *N. W. H. Addink:* Das wollte ich Ihnen gerne anraten. Ich habe es getan und wäre sehr interessiert, was Sie mit Ihrer Methode finden. Vielleicht wollen Sie einmal darüber berichten.

Literatur

[1] *A. Gatterer,* Spectrochim. Acta **1**, 513 (1941).
[2] *H. Hausner,* Dissertation. Technische Hochschule München. 1953.
[3] *H. Jagodzinski,* Neues Jb. Mineral. Mh. **1954**, 49.
[4] *O. Leuchs,* Spectrochim. Acta **4**, 237 (1950).
[5] *F. Müller* und *T. Sunde,* Die Chemie **56**, 355 (1943).

Aus dem Institut für anorganische Chemie und dem Analytischen Laboratorium der Metallgesellschaft AG., Frankfurt am Main, Deutschland

Zum Problem der Partner bei der Flammenspektrometrie

Von

J. Fischer und **A. Doiwa**

Mit 1 Abbildung

(Eingelangt am 7. April 1955)

A. Die gewählten Bezeichnungen

Einleitend sei uns eine Bemerkung zu der Bezeichnungsweise „Flammenspektrometrie" gestattet. Wie wir bereits an anderer Stelle[1] ausgeführt haben, halten wir diesen Ausdruck für richtiger und zweckmäßiger als die sonst übliche Bezeichnungsweise Flammenphotometrie. Bei dieser Methode handelt es sich — selbst wenn sie Filter zur Aussonderung der zu messenden Analysenlinie verwendet — um eine echte Spektralanalyse mit allen wesentlichen Kennzeichen dieses Verfahrens. Dementsprechend zeigt auch die als Teilgebiet der Lösungsspektralanalyse anzusehende Flammenspektrometrie die gleichen Störungen, die als das Problem der dritten Partner bekannt sind.

Die Änderung der Emission einer charakteristischen Wellenlänge eines Elementes durch das Hinzutreten eines zunächst nicht vorhandenen Partners bei sonst unveränderten Verhältnissen wollen wir als das „Problem der Partner" definieren und speziell für die Flammenspektrometrie behandeln. Die wissenschaftliche Bedeutung dieses Problems liegt auf der Hand. Für die praktische Anwendung der Flammenspektrometrie als analytische Methode bedeutet es eine beträchtliche Einschränkung der erreichbaren Genauigkeit.

B. Die Flammenspektrometrie als Mikromethode

I. Allgemeine Bemerkungen

Über die Flammenspektrometrie als analytisches Hilfsmittel ist kurz zu sagen, daß sie wegen der hohen Empfindlichkeit und wegen

der niedrigen Erfassungsgrenze eine sehr leistungsfähige Mikromethode darstellt. Ihr Wert wird noch dadurch erhöht, daß sie durch den Fortfall zeitraubender und zahlreiche Fehlermöglichkeiten bergender Trennungen und durch die Möglichkeit einer direkten Ablesbarkeit der Meßgrößen als Schnellmethode angesprochen werden muß.

II. Empfindlichkeit

Zur Bestimmung der Alkalien mit der üblichen Arbeitstechnik ohne besondere Aufwendung zur Erfassung kleinster Gehalte sind die folgenden Mengen voll ausreichend:

0,1 μg Li; 0,1 μg Na; 0,1 μg K; 0,3 μg Rb; 0,8 μg Cs.

Allerdings liegen die Verhältnisse bei den Alkalien besonders günstig. Ähnliche Empfindlichkeiten werden nur von einem kleinen Teil der dreißig bis fünfzig grundsätzlich flammenspektrometrisch bestimmbaren Elemente erzielt.

III. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Flammenspektrometrie liegt je nach Qualität der verwendeten Apparatur bei ± 2 bis $\pm 0{,}5\%$. Dieser Reproduzierbarkeit entspricht auch die Richtigkeit, so lange es möglich ist, für die Eichung Lösungen zu verwenden, die in ihrer Zusammensetzung den Analysenlösungen weitgehend gleich sind. Die Erfüllung dieser Forderung bedingt unter Umständen einen recht beträchtlichen Arbeitsaufwand. Ohne ihn können unter dem Einfluß der Partner, beispielsweise bei der Analyse von Alkalisalzgemischen, aber auch in vielen anderen Fällen erheblich Plus- und Minusfehler auftreten. Die Überwerte können 100% und mehr betragen.

C. Der Einfluß der Partner auf die Genauigkeit

I. Ausschaltung sekundärer Störungen

Es ist nun, um mit einem sehr einfachen Beispiel zu beginnen, nicht ohne weiteres zu sagen, ob die zu messende Zunahme der Intensität einer Alkalimetallinie durch Zusatz eines Alkohols einen echten Einfluß des Partners Alkohol im oben definierten Sinne darstellt. Durch diesen Zusatz werden die Verhältnisse in der Lichtquelle geändert. Erst nach der rechnerischen Berücksichtigung oder experimentellen Eliminierung kann eine Aussage über die Echtheit des Einflusses gemacht werden. Um das Beispiel zu Ende zu führen, verweisen wir auf die Abbildung. Kurve I zeigt die unmittelbar gemessene Emission von Lithium in Abhängigkeit vom Gehalt an Methanol. Die einen weitgehend anderen Verlauf zeigende Kurve II ergibt sich, wenn die durch das Methanol verursachte Änderung der Ansauggeschwindigkeit — die auf die Viskosi-

tätsänderung der Lösung zurückzuführen ist — eliminiert wird. Die Kurve III wird erhalten, wenn die unterschiedliche Oberflächenspannung rechnerisch berücksichtigt wird. Aus ihr ist ersichtlich, daß über einen weiten Bereich die Emission konstant bleibt, wenn Wasser durch Methanol ersetzt wird. Der noch verbleibende erste Anstieg der Kurve, für deren Ursache wir eine befriedigende Erklärung noch nicht geben können, zeigt, zusammen mit den Kurven I und II, anschaulich den stark komplexen Charakter des hier zu behandelnden Problems.

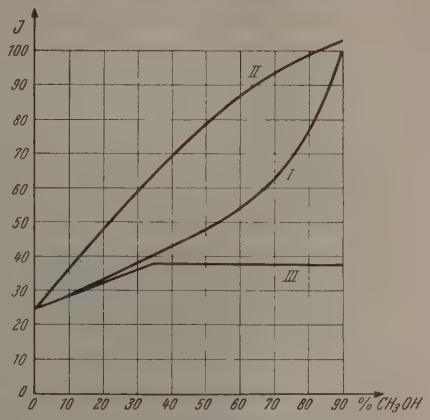


Abb. 1. Li-Emission in Abhängigkeit vom Methanolgehalt

Wir müssen danach unterscheiden zwischen sekundären Störungen und dem echten Einfluß der Partner auf die Emission. Wir werden dabei aber in einigen Fällen nicht in der Lage sein, eine eindeutige Zuordnung treffen zu können. Zu den sekundären Störungen rechnen wir vornehmlich Fremdlichtstörungen infolge mangelhafter Isolierung des Lichtes der Analysenlinie von Linien, Banden oder Kontinuen der Partner und den Einfluß der Störkomponenten auf die Ansauggeschwindigkeit der Analysenlösung, der durch eine Änderung der physikalischen Eigenschaften, vor allem der Viskosität der Lösung, bedingt ist. Diese sekundären Störungen lassen sich durch eine Vergrößerung des meßtechnischen Aufwandes — Anwendung von Monochromatoren und Kontrolle der Ansauggeschwindigkeit — fast vollständig ausschließen.

Die Änderung der physikalischen Eigenschaften der Analysenlösung bedingt aber nicht nur die experimentell leicht korrigierbare Änderung der Ansauggeschwindigkeit, sondern auch eine Veränderung der Tröpfchengröße des in die Flamme gelangenden Aerosols. Der Einfluß des Dispersitätsgrades des Aerosols auf die Emission ist in mehreren Arbeiten beschrieben worden, ohne daß eine befriedigende Erklärung für den Mechanismus dieses Phänomens gegeben werden konnte[2, 3].

II. Echte Einflüsse der Partner

1. Grundvorstellungen

Als echten Einfluß der Partner möchten wir eine Verschiebung des Dissoziationsgrades der intermediär in der Flamme gebildeten Moleküle,

ferner eine Änderung des Ionisationsgrades und damit der Anzahl der emissionsfähigen Teilchen ansehen. Sowohl die Dissoziation als auch die Ionisation sind von der Temperatur der Flamme und der Konzentration des zu bestimmenden Elementes in der Lösung abhängig. Beide werden mit zunehmender Temperatur größer, mit steigender Lösungskonzentration niedriger. Auf die Emission wirken sich aber die von Temperatur und Konzentration gleichsinnig abhängenden Faktoren entgegengesetzt aus. Die steigende Dissoziation erhöht die Emission, während eine Vergrößerung der Ionisation mit einer Verminderung der Emission verbunden ist. Dies gilt, so lange die Linien der Atome (Bogenspektren) und nicht die der Ionen (Funkenspektren) zur Messung herangezogen werden. Diese Bedingung ist praktisch immer erfüllt, weil die in der Flamme gegebenen Anregungsbedingungen entweder überhaupt nur zu den Atomlinien führen oder diese wegen ihrer größeren Empfindlichkeit bei weitem bevorzugt werden.

Die vorstehend entwickelten Vorstellungen über die Ursachen einer Emissionsbeeinflussung durch Lösungspartner enthalten keine Aussage über die Art dieser Partner, insbesondere nicht, ob sie selbst emittieren oder nicht, noch ob es sich um Anionen oder Kationen handelt. An Hand der danach möglichen Klassifizierung sollen die Störpartner behandelt werden.

2. Der Einfluß nicht emittierender Partner

a) Anionen

Ein Einfluß der Anionen konnte eindeutig nur beim Phosphation festgestellt werden, und zwar in der Weise, daß seine Anwesenheit die Emission fast aller flammenspektrometrisch bestimmbaren Elemente erniedrigt. Als Ursache hierfür muß eine unvollständige thermische Dissoziation der Phosphate angenommen werden, eine Annahme, die durch die Tatsache gestützt wird, daß die Dissoziationsenergien der Phosphate höher liegen als die anderer hier in Frage kommender Salze.

b) Kationen

Für den Einfluß nicht emittierender Kationen läßt sich als Faustregel angeben, daß diese die Emission immer vermindern, sofern sie nicht den Flammenuntergrund erhöhen. Auf die Frage des Flammenuntergrundes wird bei der Besprechung der emittierenden Partner noch einmal kurz eingegangen werden. Als wichtigstes nicht emittierendes Kation sei hier das Wasserstoffion erwähnt. Sein Einfluß ist nicht proportional seiner Konzentration. Innerhalb gewisser, relativ breiter pH-Bereiche, die von der Zerstäuberkonstruktion und der Absolutkonzentration des zu untersuchenden Elementes abhängig sind, ist die Emission konstant. Mit abnehmendem pH-Wert sinkt dann die Emission auf einen wieder über einen relativ breiten pH-Bereich konstanten Wert ab. Darüber

hinaus kommt den H-Ionen — vor allem in größeren Konzentrationen und als Schwefelsäure — insofern eine günstige Wirkung zu, als sie Störungen durch andere Partner unterdrücken und oft eine direkte Messung ohne Berücksichtigung der Störkomponenten gestatten.

3. Der Einfluß emittierender Partner

a) Kationen

Emittierende Kationen erhöhen fast immer die Emission des zu untersuchenden Elementes, wie man einwandfrei bei der Isolierung der Analysenlinien durch einen Monochromator feststellen kann. Diese nicht auf Fremdlicht zurückzuführende Störung kann nur durch eine Verringerung des Ionisationsgrades des betreffenden Elementes erklärt werden. Die Ionisation wird durch Elektronen, die von dem Störpartner stammen, zurückgedrängt und dadurch die Anzahl der anregbaren Atome erhöht.

b) Flammengase

Bei den emittierenden Partnern, die zu Fremdlichtstörungen, und zwar auch bei Verwendung von Monochromatoren, Anlaß geben können, müssen auch die Brenngase genannt werden, da sie durch ihre unterschiedliche Eigenemission den Flammenuntergrund in bestimmten Spektralbereichen sehr groß werden lassen und damit nicht nur die Empfindlichkeit der in diesen Spektralbereichen liegenden Linien, sondern auch die Genauigkeit der Messung selbst erheblich verringern. Bei der Wahl der Flamme ist deshalb nicht allein auf die optimale Temperatur Rücksicht zu nehmen, sondern auch auf ihre Eigenemission im interessierenden Bereich.

4. Der Einfluß der Temperatur

Bei der Betrachtung des Störeinflusses muß auch kurz auf den großen Einfluß der *Temperatur* auf die Emission reiner Alkalisalze eingegangen werden. Rein experimentell ist festzustellen, daß mit steigender Temperatur die Emission des Lithiums zunimmt, während die des Natriums konstant bleibt. Bei den schweren Alkalimetallen schließlich sinkt die Emission mit steigender Temperatur*, und zwar um so stärker, je höher das Atomgewicht ist. Vorstellungen über das Zusammenspiel zwischen Ionisation und Dissoziation sind aus diesen Befunden leicht abzuleiten, genauere Messungen, die die Grundlage für die mathematische Erfassung dieser Vorgänge bilden müßten, fehlen noch.

Untersuchungen über den Einfluß der Flammentemperatur auf die Größe der Störungen liegen für Rubidium und Cäsium vor[4]. Bei diesen

* Dies gilt nur für die hier zur Diskussion stehenden Bogenlinien. Die Intensität der Funkenlinien steigt dabei an.

Metallen wird mit sinkender Temperatur die Störung (Intensitätserhöhung) durch die anderen Alkalimetalle kleiner.

5. Der Einfluß der Konzentration

In gleicher Weise wie eine Erniedrigung der Temperatur wirkt sich eine Erhöhung der *Konzentration* des *Rubidiums* und *Cäsiums* in der Flamme aus. Jedenfalls haben wir beim Rb und Cs bestätigen können, daß die durch Fremdalkalien bedingten Fehler im Bereich von 10 bis 100 mg/l kleiner sind als im Bereich von 1 bis 10 mg/l.

Gerade umgekehrt liegen die Verhältnisse beim *Lithium* und wahrscheinlich auch beim Natrium und Kalium. Die in der Literatur angegebenen Meßkonzentrationen für Li, Na und K sind im allgemeinen um eine Zehnerpotenz höher als die von uns als optimal erkannten. Es werden dann Störungen beschrieben und Vorschläge zu ihrer Vermeidung diskutiert, die gar nicht erst auftreten, wenn man mit verdünnteren Lösungen arbeitet. Um ein Beispiel zu geben: Es stören die in gewissen Lithiumerzen vorhandenen Mengen von Al, Na und K bereits jedes für sich die Li-Bestimmung empfindlich, wenn man im Konzentrationsbereich von 10 bis 100 mg Li/l mißt. Nimmt man die Messung dagegen im Bereich von 1 bis 10 mg Li/l vor, so sind Störungen nicht zu beobachten, selbst wenn man die relative Konzentration der Störpartner noch wesentlich erhöht. Bei dem Versuch einer Deutung des unterschiedlichen Verhaltens des Li wird vermutlich das hohe Ionisationspotential dieses Elementes zu berücksichtigen sein. Die mit steigender Temperatur zunehmende Emission des Li könnte durch die Annahme gedeutet werden, daß hier die Bildung einer sehr stabilen Verbindung (LiOH, *Sugden*[5]) und deren thermische Dissoziation eine entscheidende Rolle spielen.

Wenn auch der kurze Überblick über die Probleme der gegenseitigen Beeinflussung gezeigt hat, daß wir von dem Endziel der Flammenspektrometrie — der direkten Bestimmung der Elemente ohne Berücksichtigung der anderen Lösungspartner — und der Klärung der Ursachen und des Mechanismus der Störungen noch ziemlich weit entfernt sind, so sei doch abschließend festgestellt, daß die Flammenspektrometrie zurzeit die einzig brauchbare Methode für die Analyse von Alkaligemischen darstellt.

Zusammenfassung

Die Flammenspektrometrie — eine ausgezeichnete Mikromethode insbesondere für Gemische von Alkalien — erfordert bei quantitativen Aussagen die sorgfältige Berücksichtigung des Einflusses der Lösungsgenossen (Partner). Neben sekundären Störungen (Fremdlicht, Änderung der Zerstäubungsbedingungen), die sich weitgehend ausschalten lassen,

treten durch Beeinflussung der Dissoziation und Ionisation in der Flamme echte Störungen auf. Es wird der große Einfluß der Temperatur und der Lösungskonzentration auf die durch Partner bedingten Fehler behandelt.

Summary

Flame photometry, an excellent micromethod particularly for mixtures of alkalis, demands the most careful consideration of the influence of cosolutes (partners) if quantitative data are demanded. In addition to secondary interferences (foreign light, alteration of the atomizing conditions) which are readily eliminated, real interferences occur because of the influence of dissociation and ionization in the flame. The great influence of the temperature and the concentration of the solution on the error arising from the cosolutes is discussed.

Résumé

La photométrie de flamme est une excellente microméthode, particulièrement pour les mélanges d'alcalis; mais elle demande une étude très soignée de l'influence des autres substances dissoutes si l'on désire obtenir des données quantitatives précises. En plus d'interférences secondaires (lumière parasite, modification des conditions de vaporisation) qui sont aisément éliminées, des interférences réelles proviennent de la dissociation et de l'ionisation dans la flamme. On discute l'influence importante de la température et de la concentration de la solution sur l'erreur correspondant à l'influence des corps dissouts.

Diskussion

H. *N. W. H. Addink* (Eindhoven): Ist es möglich, über den Einfluß der Brenngase auf den Untergrund etwas zu sagen?

H. *J. Fischer:* Die Flammenwirkung auf den Untergrund ist untersucht und auch festgelegt. Die Verhältnisse liegen um so günstiger, je weniger Kohlenstoff in der Flamme ist. Wenn man mit Wasserstoff-Sauerstoff arbeitet, ist der Untergrund verhältnismäßig sauber.

H. *N. W. H. Addink:* Man könnte sich doch vorstellen, daß kleine Kohleteilchen entstehen, die dann doch eine Rolle spielen.

H. *J. Fischer:* Ich glaube nicht, daß das eine Rolle spielt, solange man, wie wir es getan haben, mit anorganischen Salzen arbeitet. Wenn Sie mit Acetylen, Stadtgas oder Propan arbeiten, ist natürlich Kohlenoxyd da, das den Flammenhintergrund verstärkt und die Messungen schwieriger macht. Darauf müßte mehr Rücksicht genommen werden als bei der einfachen Wasserstoff-Sauerstoff-Flamme. Die Tendenz geht dahin, diese Empfindlichkeit zu steigern und mit immer heißerer Flamme zu arbeiten. Aber, wie Sie aus dem Bild gesehen haben, ist das nicht generell richtig, sondern die schweren Alkalimetalle sind empfindlicher, wenn man mit einer kälteren Flamme arbeitet.

H. *R. Hamm* (Kulmbach): Ich möchte fragen, in welcher Art und Weise Sie die Oberflächenspannung berücksichtigen? Sie haben ja korrigiert. Wie geht diese Korrektur vor sich? Sie berücksichtigt wohl in erster Linie den Einfluß der Oberflächenspannung auf die Tröpfchengröße.

H. *J. Fischer:* Es handelt sich um eine rein empirische Angelegenheit. Die Tröpfchengröße hängt von der Oberflächenspannung ab, je kleiner diese, um so kleiner muß das Tröpfchen sein und um so größer die Intensität der Emission unter sonst gleichen Bedingungen. Deshalb gehen nachher die Kurven zurück.

H. *R. Hamm:* Offenbar ist der Einfluß der Oberflächenspannung sehr eindrucksvoll. Der Einfluß des p_H-Wertes ist demgegenüber ja nicht sehr groß und die Frage ist, ob dieser vielleicht sekundär auch über die Oberflächenspannung geht. Denn ich nehme an, die Oberflächenspannung wird ihrerseits auch vom p_H-Wert abhängen.

H. *N. W. H. Addink:* Dazu möchte ich fragen: Wie ist die Konstruktion dieses Apparates? Nimmt man nur von einer Schicht über den Querschnitt der Flamme etwas Licht heraus oder nimmt man die ganze Flamme?

H. *J. Fischer:* Man nimmt den mittleren Teil der Flamme und verwendet einen Spiegel, um genügend Licht zu haben. Sicherlich empfinde ich es durchaus als einen Mißstand, wenn man nicht die einzelnen Partien der Flamme untersucht, sondern kollektiv die Flamme als solche benützt.

H. *N. W. H. Addink:* Vor einem oder zwei Jahren wurde dieser Apparat von Beckman aus dem Handel genommen, nachher kam er wieder in den Handel. Die Ursache dafür ist, daß man so große Schwierigkeiten hat. Ich meine, es wäre doch viel besser, genau so einen Querschnitt herauszunehmen. Man kann dann nämlich die Frage beantworten, welchen Einfluß das p_H auf die Tröpfchengröße bzw. auf die Oberflächenspannung hat.

H. *R. Hamm:* Die Höhe der Flamme läßt sich natürlich jederzeit einstellen, aber da die Flamme ja wenig absorbiert, erhält man immer einen Mittelwert aus verschiedenen Zonen in der Tiefe der Flamme, es sei denn, man verwendet eine Randzone. Diese läßt sich für sich allein verwenden. Wenn man aber die Mitte der Flamme ansieht, bekommt man immer einen Durchschnittswert über alle Schichten aus der Tiefe der Flamme. Ich glaube dagegen ist nicht viel zu machen.

H. *J. Fischer:* Vorläufig ganz sicher nicht. Inwieweit die Oberflächenspannung mit den p_H-Werten zusammenhängt, bin ich überfragt, glaube aber nicht, daß der Zusammenhang der ist, den wir hier gesehen haben.

H. *H. Straubel* (Jena): Sie sprachen davon, daß offenbar mit dem Kleinerwerden der Tröpfchen die Empfindlichkeit ansteigt. Wie ist es denn nun, wenn man ganz extreme Verhältnisse wählt und einen Dampf hineinbläst, d. h. also die Temperatur der zerstäubten Substanz so hoch treibt, daß praktisch keine Tröpfchen mehr, sondern alles als Gas vorliegt?

H. *J. Fischer:* Ich glaube, das scheitert bis jetzt an den technischen Schwierigkeiten.

H. *H. Straubel*: Es muß ja nicht gerade der Beckman-Zerstäuber sein. Bei einem Zerstäuber mit größerem Zuführungsrohr könnte man vorher so stark aufheizen, daß auf jeden Fall völlige Verdampfung eintritt, so daß keine Tröpfchen in diesem Sinne mehr vorhanden sind.

H. *N. W. H. Addink:* Hier haben wir es aber mit der Verdampfung einer wäßrigen Salzlösung zu tun, das Salz bliebe in der Kammer zurück und das Wasser würde weitergeleitet.

H. *H. Straubel:* Das Salz wird aber doch im Luftstrom mitgerissen.

H. *N. W. H. Addink:* Nein, nein.

H. *J. Fischer:* Das ist sehr schwierig. Beckman hat es ursprünglich versucht. Er hat zuerst zerstäubt und dann den Raum geheizt, so daß also kein Ausflocken auf dem Weg zum Brenner stattfinden kann. Ich habe ein Trägergas verwendet und habe in diesem Zusammenhang auch das Bild für die Lösungsspektralanalyse gezeigt. Ebendenselben Einfluß hat auch da die Verschiebung der Intensität nur durch den anderen Partner.

H. *G. Hansen* (Oberkochen): Es ist doch wohl überhaupt eine Frage, über die wir noch sehr wenig unterrichtet sind: Welche Geschichte erfährt der Tröpfchennebel in der Flamme beim Aufsteigen? Ist Ihnen etwas über die Verteilung der Tröpfchengröße im Inneren der Flamme bekannt? Ein Verdampfungsprozeß findet ja statt, die Tröpfchen werden kleiner, aber wie geschieht das eigentlich.

H. *J. Fischer:* Es ist viel auf diesem Gebiet gearbeitet worden. Ich habe keinen Namen genannt, aber es gibt darüber hundert Arbeiten.

Literatur

[1] *H. Kaiser, J. Fischer* und *K. Laqua*, Analyse der Metalle. Bd. II/2. Berlin: 1953.

[2] *F. T. Egertsen, G. Wilde* und *L. Lykken*, Symposium on Flame Photometry. ASTM **1951**, 52.

[3] *R. D. Caton* und *R. W. Bremner*, Analyt. Chemistry **26**, 805 (1954).

[4] *A. Doiwa*, Diplomarbeit, Frankfurt am Main, Februar 1955.

[5] *T. M. Sugden* und Mitarb., Proc. Roy. Soc. London **A 211**, 58 (1952).

Laboratoires de Chimíe Analytique de la Faculté de Science et du Conseil supérieur de la Recherche-Scientifique-Madrid (Espagne)

Applications de la photométrie de flamme à l'analyse des éléments différents aux alcalins et alcalino-terreux

Par

F. Burriel-Martí, J. Ramírez-Muñoz et M. C. Asunción-Omarrementería

Avec 10 figures

(Reçu le 17 Mai 1955)

I. Introduction

Depuis quelques années nous avons poursuivi des nouvelles méthodes et des améliorations des méthodes déjà employées pour le dosage des éléments métalliques des alliages et spécialement dans les aciers. Nous avons développé des méthodes analytiques par volumétrie, spectrophotométrie, polarographie et spectrographie et, finalement, nous avons étudié aussi des applications de la photométrie directe des émissions de la flamme — c'est à dire, la *photométrie de flamme* – au dosage de quelques métaux dans les alliages spéciaux.

On ne peut pas dire que la photométrie de flamme pourrait rivaliser toujours avec d'autres sources d'excitation, parmi lesquelles on trouve l'arc et l'étincelle, mais sans arriver à une substitution complète de ces sources dans tous les problèmes analytiques à resoudre par voie spectrale, elle nous permet d'avoir un précieux complèment instrumental dont les principales qualités sont une remarcable simplicité pour la préparation des échantillons et pour la mesure, la rapidité et l'économie.

Les méthodes analytiques par photométrie de flamme ont été acceptées universellement pour les dosages de sodium, potassium et calcium dans les échantillons biologiques ou minéraux, mais leurs applications pour l'analyse d'autres éléments ne sont pas si fréquentes[2, 7, 9]. A coté des métaux alcalins et des alcalino-terreux ci-haut nommés, la photométrie de flamme permet des mesures de métaux facilement excitables avec la flamme: des alcalins (lithium, rubidium, caesium), des alcalino-terreux (strontium, barium), et aussi magnésium, thallium, manganèse, fer, cuivre,

argent etc. Parmi ces éléments il y a quelques métaux dont la sensibilité est si petite qu'il ne nous suffit pas l'enregistrement instantané quand sa concentration relative dans les échantillons est très étendue et on a besoin, dans ces cas, de l'enregistrement photographique des émissions sur la plaque avec le spectrographe.

Avec la mesure directe on ne peut pas avoir des donnés quantitatives pour des éléments peu excitables et ils doivent être décelés et enregistrés au moyen d'expositions assez longues, qui donnent des raies spectrales de noircissement suffisant.

Cependant ces indications, les méthodes de flamme sont applicables aux dosages de nombreux éléments métalliques fréquents dans les alliages et produits métallurgiques. Les difficultés de la détermination de ces éléments par photométrie de flamme dans ces materiaux, sont principalement influencé par trois facteurs: 1) Sa petite sensibilité dans la flamme — ce qui rend impossible le dosage de très petites teneurs dans les échantillons ou de très petites concentrations dans les solutions preparés —, 2) l'existence dans les échantillons liquides des divers métaux qui donnent très nombreux raies et bandes spectraux — ce qui produit des interférences par position —, et 3) la grande concentration de certains macro-constituants des échantillons qui provoquent des interférences par variation de l'émission de l'élément d'analyse, par production de fond de flamme ou par superposition des raies ou des bandes pendant la mesure expérimentale avec le photomètre.

Nous pourrons trouver des exemples de tous ces cas particuliers dans l'analyse des éléments qui accompagnent au fer dans les aciers spéciaux.

Nous avons essayé de doser quantitativement par photométrie de flamme les éléments cobalt, nickel, chrome et manganèse dans les aciers. Les déterminations seront correctes quand les constituants sont contenus en grande concentration dans les échantillons originaux et qu'il soit permis de les manipuler à une concentration suffisamment élevée dans les solutions preparées pour l'analyse.

Les modes opératoires que nous avons employés peuvent étendre les possibilités de dosage dans un intervalle de concentration tres etendue. (Intervalle de concentration dans les solutions preparées.) De même la teneur de ces éléments dans les échantillons peut être admise dans un intervalle de grande extension aussi.

L'étude de ce problème nous a établi la suivante distribution de nos travaux: l'étude de la détermination particulière de chaque élément, la separation préalable des macro-constituants (le fer dans notre cas des aciers), l'étude du problème des interférences, la séparation préalable des éléments d'analyse qui provoquent excessive interférence, et les systèmes de mesure et de correction.

Dans cette communication nous avons resumé les differentes étapes mentionées ci-dessus et les résultats obtenus dans l'étude de ces éléments par la méthode de photométrie de flamme.

II. Technique expérimentale

1. Appareils

Nous avons utilisé dans ces travaux le spectrophotomètre de flamme Beckman DU, n° 9200, avec des phototubes non multiplicateurs, le brûleur étant alimenté par un melange d'oxygène et d'acétylène.

a) Pressions

Le contrôle des débits et des pressions de l'acétylène a été reglé en considérant la pression de régime nécessaire pour maintenir un écoulement critique de l'oxygène pour transporter les échantillons liquides pendant l'alimentation de la flamme. La pression de l'oxygène est donnée comme une fonction des constantes de fabrication du brûleur. Les valeurs les plus convenables des pressions d'alimentation ont été 10 livres par pouce carré pour l'oxygène et 5 pour l'acétylène. Les bouteilles des gaz ont été munies de mano-détenteurs doubles avec des valves de membrane et de pointeau. L'écoulement constant de l'oxygène et de l'acétylène a été reglé aussi par le dispositif de détente Beckman.

b) Fente

La largeur de la fente a été conditionnée par la limite supérieure des intervalles expérimentaux de concentration. Nous avons eu besoin de fentes assez larges pour les éléments nickel, cobalt et chrome dont la sensibilité est plus petite par rapport au manganèse, ce qui a augmenté les probabilités d'interférences par position, determinées par l'apparition des phenomènes de chevauchement des raies et des bandes. En outre l'on observe une diminution de la résolution et l'apparition de fonds de flamme très intenses. Une fente trop étroite aurait limité excessivement la sensibilité des mesures et aurait réstreint les limites des intervalles de concentration utilisables.

e) Longueur d'onde

Les valeurs de la longueur d'onde sont données dans le Tableau I

Tableau I. Concentrations, fente et longueur d'onde

Élément	Concentration p. p. m.	Fente mm	Longueur d'onde mμ
Co	De 0 à 1000	0,7	353,0
Ni	De 0 à 3000	0,6	325,5
Cr	De 0 à 4000	0,4	425,4
Mn	De 0 à 1000	0,3	403,3

vis-à-vis de ceux de la largeur de la fente et des concentrations utilisées dans nos travaux.

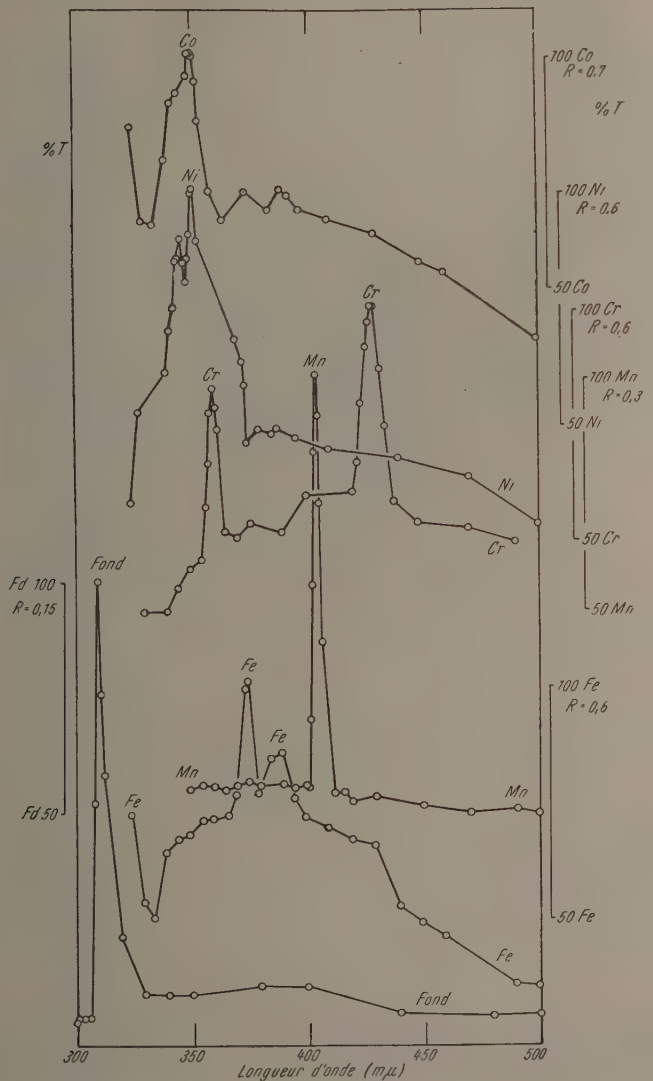


Fig. 1. Spectres d'émission de flamme des éléments Co, Ni, Mn, Cr, Fe et du fond de la flamme obtenu avec de l'eau distillée

Nous avons répresenté dans la Fig. 1 les courbes expérimentales des spectres d'émission des éléments analysés, qui ont été obtenus sous les conditions opératoires décrites.

2. Courbes d'étalonage

On a preparé deux séries de solutions étalons pour chaque élément d'analyse:

a) Solutions étalons aqueuses des sels (Ni^{II}, Co^{II}, Mn^{II} et Cr^{III}).

b) Solutions étalons aqueuses acides (6 ml de SO_4H_2 concentré pour chaque 100 ml de solution) des mêmes sels avec 30 p. p. m. de fer.

Tous les deux avec une limite supérieure de concentration égale à celle exprimée dans le Tableau I et successives dilutions dans les rapports $^1/_2$, $^1/_5$ et $^1/_{10}$ de la concentration initiale.

Ce nous a donné 8 séries de solutions étalons, deux pour chaque élément, dont les solutions acides ont une teneur finale de 30 p. p. m. de fer, égale à celle de l'étalon initial.

Les courbes d'étalonage ont été répresentées dans la Fig. 2. Celles

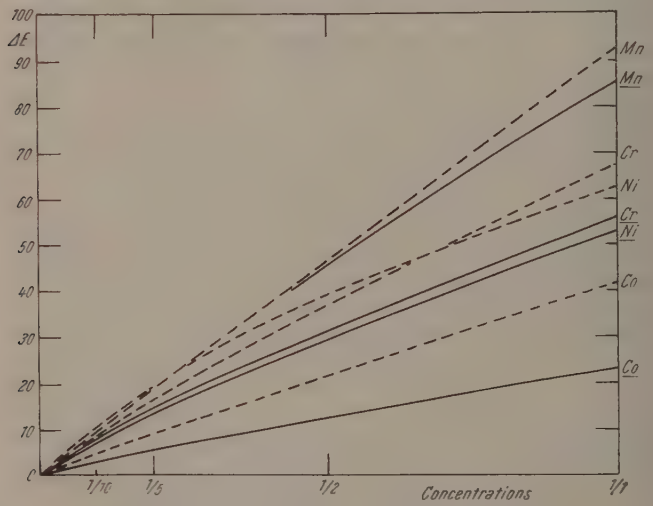


Fig. 2. Courbes d'étalonage. ($\Delta E = \%T_{\text{Élément}} - \%T_{\text{Fond}}$)

à traits discontinus correspondent aux solutions aqueuses sans addition de l'acide sulfurique et du fer.

Les mesures expérimentales obtenues avec les solutions analysées sont portées sur les courbes d'étalonage pour avoir des résultats en p. p. m.

3. Extraction

a) Séparation préalable du fer par extraction

On a vérifié expérimentalement quelques solvants organiques pour l'extraction du fer par distribution entre deux phases liquides non miscibles (l'éther, l'éther isopropylique et l'éther dichloroéthylique). L'extraction a été realisée toujours sur des solutions chlorhydriques de 1 g de fer dans 100 ml initiaux, avec une teneur de ClH 8 N environ.

Parmi les solvants vérifiés, l'éther isopropylique nous a donné des meilleurs résultats.

L'extraction avec l'éther éthylique ne permet pas des récuperations si quantitatives. *Kuemel* et *Karl*[8] ont trouvé des concentrations residueles de 300 p. p. m. de fer après les extractions avec de l'éther dans l'étude des éléments alcalins et alcalino-terreux dans des échantillons métallurgiques par photométrie de flamme. Dans les travaux de ces auteurs, une teneur de 300 p. p. m. n'a pas des effets importantes, mais cette teneur nous pourrait produire un abaissement de la sensibilité et de la précision pour les dosages du cobalt, nickel et chrome spécialement.

L'éther dichloroéthylique ne se prête pas à une séparation instantanée des deux couches liquides. Ce que produit un retard considérable pendant la préparation initiale des échantillons.

Les conditions de température, d'acidité, les volumes initiales, les quantités de solvant, le nombre des agitations et la durée de l'agitation ont demeuré strictement constantes à fin d'éviter des variations du coéfficient de distribution. Ses variations peuvent être effectuées, en outre, par des éffêts dûs aux sels de la solution et peuvent donner des concentrations supérieures de fer dans les solutions déjà agitées avec le solvant.

En tout cas on a mesuré les teneurs résidueles de fer avec un spectrophotomètre Beckman DU par colorimétrie du fer par la méthode du complexe Fe^{III}-salicylate, que nous avons utilisée dans quelques travaux déjà publiés[4, 5].

L'éther isopropylique a été utilisé aussi comme solvant pour la séparation du fer dans des échantillons analysés par spectrographie d'émission et pour la séparation du fer et son dosage par photométrie de flamme dans des échantillons de sels qui ont aussi des concentrations variables de cobalt, manganèse et cuivre, c'est à dire, des métaux aussi excitables par la flamme[6, 11].

b) Séparation préalable du nickel par extraction

Les échantillons liquides privés du fer par extraction ont été préparés d'abord au moyen d'une nouvelle méthode de séparation; cette fois pour la séparation du nickel.

Le nickel est précipité avec la diméthylglyoxime; on ajoute du citrate

d'ammonium (ou de l'acide citrique et de l'ammoniaque) et on retire le précipité par extraction avec du chloroforme. La solution agitè avec le chloroforme doit être légèrement ammoniacale.

Le nickel est eliminé de nouveau de la solution chloroformique par agitation avec l'acide chlorhydrique 5 N. On ajoute un peu de l'acide sulfurique et de l'acide nitrique (Quantité suffisante pour rendre la solution a peu près 4 N) et on détruit le residu de matière organique qui reste après ces opérations*. Cette solution peut être mesurée directement dans le photomètre.

On ajoute du citrate d'ammonium et non du citrate de sodium pour éviter le sodium dans les solutions qui doivent être mesurées par photométrie de flamme. Des petites quantités de sulfate d'ammonium qui restent en solution n'affectent pas les dosages. Une teneur considérable de sels d'ammonium peut affaiblir les émissions.

c) Effet de la séparation du nickel par extraction

On a vérifié la méthode de séparation du nickel avec des échantillons synthétiques. La récupération a été comprise entre + 6,0 et + 3,0% avec des solutions d'une concentration de 1000 à 600 p. p. m. de nickel. Dans ces expériences on retire le nickel des solutions sur lesquelles on a fait d'abord une extraction préalable du fer. Donc l'erreur correspond à deux extractions.

d) Effets des séparations par extraction sur les autres éléments

Nous avons mesuré dans des solutions synthétiques les concentrations des éléments cobalt, chrome et manganèse après d'avoir fait l'extraction du fer. Avec une seconde série d'échantillons synthétiques on a dosé les teneurs des mêmes éléments après l'extraction du nickel avec la diméthylglyoxime et du chloroforme. On a resumé les résultats dans le Tableau II.

Tableau II. Effets des extractions

Élément	Concentration p. p. m.	Effets
Co	100	Valeurs légèrement affaiblies en moins du 10%
Cr	500	Aucun
Mn	100	Aucun

La diminution de la concentration du cobalt après avoir retiré le nickel peut être retrogradée si on opére par double précipitation avant

* On peut retirer l'excès de diméthylglyoxime en agitant la solution chlorhydrique avec de l'éther.

de faire l'extraction de la diméthylglyoxime nickélique. Les erreurs dans les mesures du nickel sont diminuées aussi.

4. Etude des interférences

a) Etude des interférences dans les solutions aqueuses

Nous avons réalisé une étude préalable des interférences des éléments d'analyse dans des mélanges binaires en solution aqueuse et aussi des interférences de chacun de ces éléments et du fer.

α) Mélanges binaires des éléments d'analyse

Pour obtenir des résultats on a utilisé des solutions aqueuses des sels sans ajouter de l'acide sulfurique et du fer. On a étudié les interférences dans quatre systèmes de courbes expérimentales qui répresentent:

1° Des p. p. m. trouvées expérimentalement de chaque élément en fonction des p. p. m. théoriques du même élément, ce qui nous donne des systèmes de courbes divergentes (Une courbe pour chaque concentration d'élément interférent).

2° Des p. p. m. expérimentales de l'élément d'analyse en fonction des p. p. m. de l'élément interférent, ce qui nous donne des systèmes de courbes séparées des niveaux horizontaux (Une courbe pour chaque concentration de l'élément d'analyse).

3° Des pourcentages d'erreur (des données moyennes) sur les valeurs des teneurs théoriques en fonction des p. p. m. de l'élément interférent.

4° Des pourcentages d'erreur (des données moyennes) sur les valeurs des teneurs théoriques en fonction du rapport p. p. m. de élément interférent/p. p. m. de l'élément d'analyse.

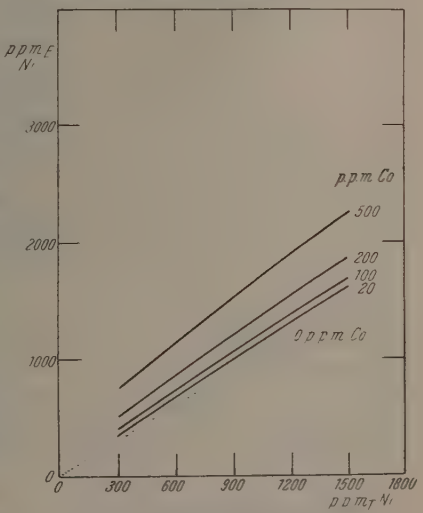


Fig. 3. Influence de Co sur le Ni

Dans la Fig. 3 et suivantes on a répresenté quelques systèmes de courbes correspondant aux paragraphes énumerés ci-dessus*.

* Une collection complète des courbes d'interférence est donnée dans la thèse de Mlle. *M. C. Asunción*[1].

Les concentrations absolues de ces éléments, employées pour blétair un intervalle de suffisante amplitude des teneurs affectées par les interférences, sont detaillées dans le Tableau III.

Tableau III. Intervalles de concentration

Élément	Intervalle p. p. m.
Co	De 20 à 500
Ni	De 60 à 1500
Cr	De 80 à 2000
Mn	De 20 à 500

Résultats. De cet étude préalable on est arrivé à une série de conclusions concernant les effets de chaque élément sur les autres, et d'abord on observe une exaltation des radiations enregistrées, avec l'exception des cas ou on a mesuré l'influence du nickel ou du cobalt sur le manganèse. (Voir les Fig. 3 à 6.) Voici les résultats:

1° Le nickel est interféré fortement par le chrome et aussi, selon un rapport décroissant, par le cobalt et le manganèse.

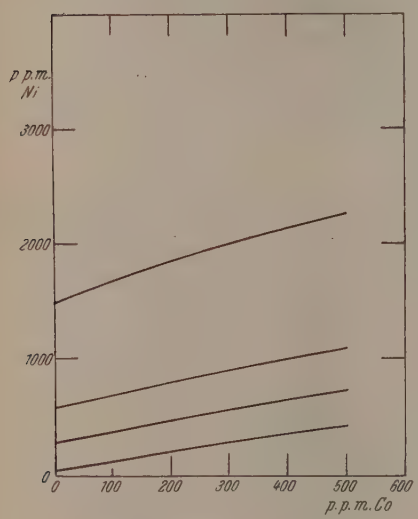


Fig. 4 *a*. Influence du Co sur le Ni

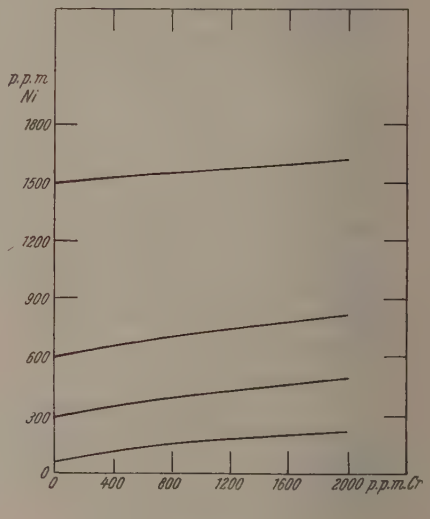


Fig. 4 *b*. Influence du Cr sur le Ni

2° Le cobalt est interféré et exalté particulièrement par le nickel et aussi par le manganèse et le chrome.

3° Le chrome par le manganèse d'abord et après par le cobalt et le nickel, et, finalement.

4° Le manganèse par le chrome, le cobalt et le nickel dans cet ordre décroissant.

Les troubles produits par le nickel sur le cobalt, spécialement, et

sur les autres métaux et ceux qui sont produits par ces autres métaux sur le nickel nous ont déterminés a faire la séparation préalable, ce que nous avons décrit. On peut donc profiter de l'avantage de la séparation du nickel et on suprime ainsi l'influence des autres métaux sur ce demier et sa propre interférence de position et radiation sur les composants métalliques de la solution primitive. (Voir plus loin.)

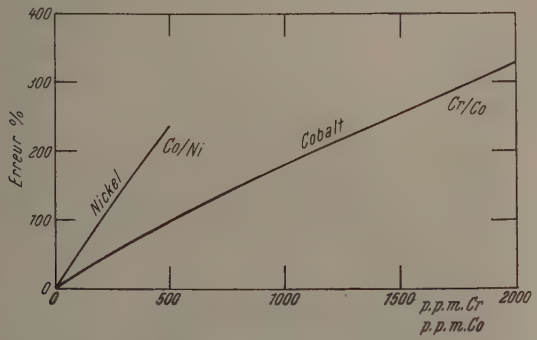


Fig. 5. Erreurs dues à des rapports croissantes p. p. m. de Cr/p. p. m. de Co et p. p. m. de Co/p. p. m. de Ni

Si on mesure des teneurs de nickel ou de cobalt tout ensemble il serait impossible d'arriver à une complète definition ou séparation totale des émissions plus intenses, parce qu'on devrait employer des fentes trop étroites. Dans ces conditions la sensibilité deviendrait si affaiblie que l'on ne pourrait pas arriver aux dosages des petites teneurs.

Pour d'autres éléments l'interférence par position, c'est à dire, par chevauchement des émissions à la même longueur d'onde, n'est pas si remarcable, car il n'y a pas des superpositions totales, mais elle nous produit encore des interférences observables, comme résultat des émissions placées près de l'émission mesurée dans l'appareil et aussi des fonds de flamme produits par des bandes larges, qui correspondent aux autres éléments métalliques en solutions lesquelles peuvent être placées près ou sous la raie ou bande qu'est mesurée.

On ne doit pas oublier qu'il y a de raies qui sont décelées comme une bande ou une inflexion du fond, parce qu' on ne peut pas les séparer avec des fentes trop larges, comme on peut observer dans la Fig. 1, où il y a des bandes expérimentales qui sont veritablement des courbes apparentes produites par un ensemble de raies très prochaines.

β) Mélanges binaires des éléments d'analyse avec le fer

Nous avons supposé d'abord que nous aurions besoin d'une séparation préalable du fer.

Le séparation du fer pourrait être mise au point au moyen des extrac-

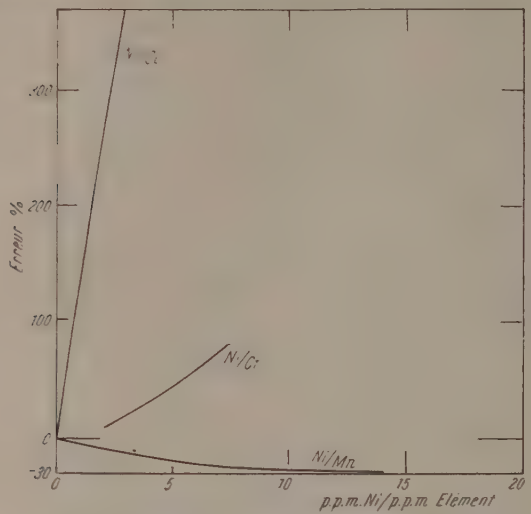


Fig. 6*a*. Erreurs sur les éléments en fonction du rapport p. p. m. Ni/p. p. m. Élément

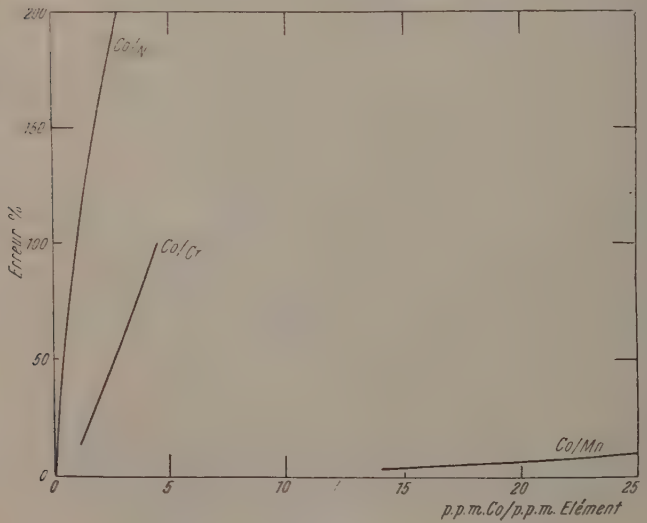


Fig. 6*b*. Erreurs en fonction du rapport p. p. m. Co/p. p. m. E.

tions en solution fortement chlorhydrique par des solvants organiques, mais des nombreuses extractions nous prolongue excessivement le temps

de préparation des échantillons et aussi peut provoquer une abaissement

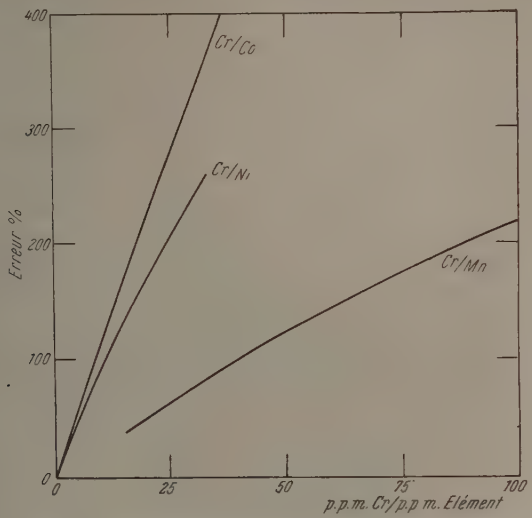


Fig. 6*c*. Erreurs en fonction du rapport p. p. m. Cr/p. p. m. E.

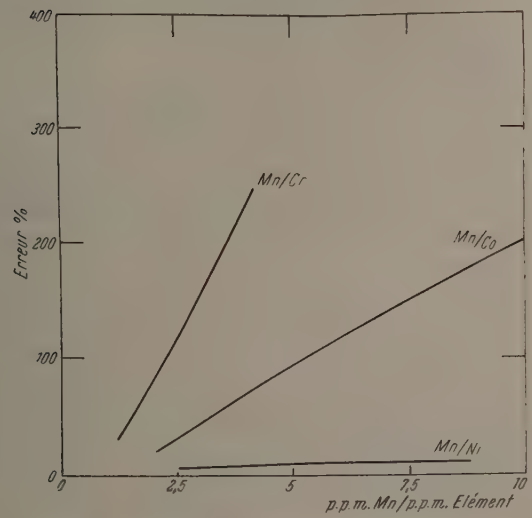


Fig. 6*d*. Erreurs en fonction du rapport p. p. m. Mn /p. p. m. E.

de la concentration de certains éléments d'analyse, si on perd des fractions de solution aqueuse pendant la séparation des couches liquides.

On doit donc effectuer une extraction ou deux, si l'on peut extraire ainsi la plupart du fer et seulement reste dans la phase aqueuse une petite quantité de ce métal, surtout si on observe que des faibles concentration de fer ne provoquent des grands effets sur les mesures des autres composants.

Nous avons obtenu des résultats avec des séries de solutions contenant de fer et chacun des éléments d'analyse. Les concentrations

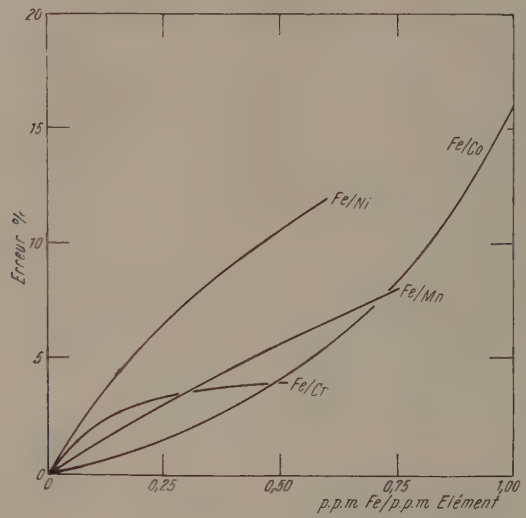


Fig. 7. Erreurs en fonction du rapport p. p. m. Fe/p. p. m. E.

du fer dans les solutions preparées ont été supérieures à celles que l'on pourait trouver comme teneur résiduele après l'extraction du fer avec des solvants organiques.

L'effet du fer sur les valeurs théoriques des autres éléments est répresenté par la séquence croissante Cr < Mn < Co < Ni. (Voir Fig. 7.)

b) Etude des interférences dans les solutions acides

On a étudié les interférences produits par les éléments d'analyse cobalt, chrome et manganèse dans les mesures mises au point avec des solutions prélevées de nickel, les solutions étant acides et ayant une teneur de 30 p. p. m. de fer.

α) Mélanges binaires de deux éléments d'analyse

Les intervalles de concentration pour ces expériences sont donnés dans le Tableau IV.

On a trouvé, en général, des augmentations des radiations de l'élément dosé produits par le second métal. Les interférences ont été placées sous le même régime que ceux observées pour les solutions aqueuses non acides. (Voir plus haut.) Il y a cependant des différences. Ce sont, par exemple l'influence Mn > Cr sur le cobalt, laquelle est inversée en solution acide: Cr > Mn.

Tableau IV. Intervalles de concentration

Élément	Intervalle p. p. m.
Co	De 50 à 500
Cr	De 500 à 2000
Mn	De 50 à 500

Les valeurs expérimentales ont été répresentées en fonction des p. p. m. de l'élément interférent sur des échelles double logarithmiques[10]. On a des séries de courbes rectilignes de pente différente qui est d'autant plus grande que la concentration absolue de l'élément d'analyse dans les solutions, que sa concentration relative par rapport à celle de l'élément interférent est plus petite.

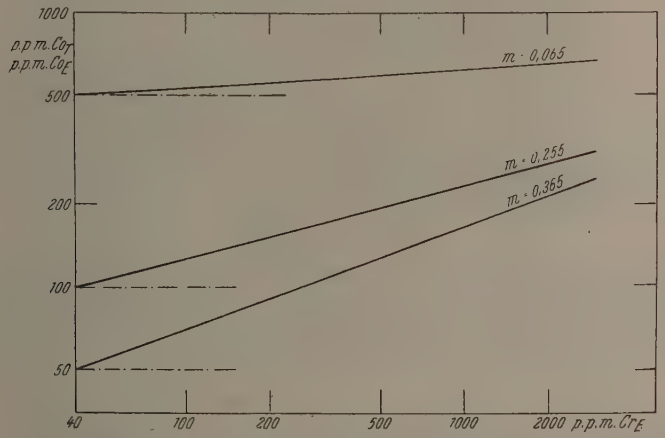


Fig. 8. Valeurs apparentes du Co en fonction des concentrations croissantes du Cr. Les teneurs théoriques croissent avec les concentrations du Cr suivant les courbes

L'équation de ces courbes est une fonction linéaire donnée par l'expression:

$$\log F = \log \frac{\text{p. p. m.}_E \text{ E. A.}}{\text{p. p. m.}_T \text{ E. A.}} = m \log \frac{\text{p. p. m.}_E \text{ E. I.}}{\text{p. p. m.}_T \text{ E. I.}}$$

En tout cas on utilise une valeur limite de p. p. m. de l'élément interférent égal à 2% de la concentration supérieure.

On suppose que cette petite concentration n'affecte pas les dosages de l'élément à analyser*. (Voir Fig. 8.)

Pour chaque valeur de l'élément interférent des diverses valeurs de la constante m sont applicables, ce qui donne une série de courbes montrant répresentations graphiques m en fonction des p. p. m. de l'élément d'analyse. On peut faire la correction au moyen de ces courbes. (Fig. 9.)

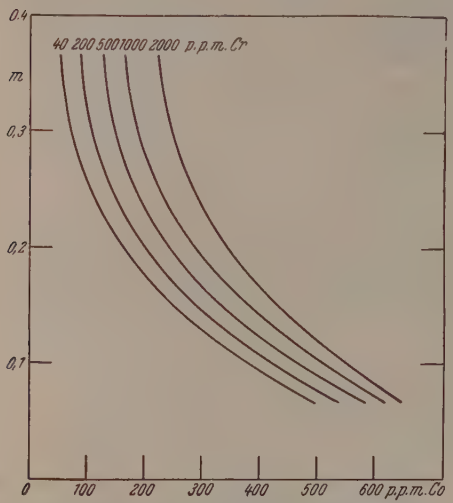


Fig. 9. Courbes des valeurs de m en fonction des p. p. m. du Co et des p. p. m. du Cr. (Voir Fig. 8.) Le Cr comme élément interférent et le Co comme élément d'analyse

On peut calculer des valeur du facteur F avec l'équation antérieure, les valeurs théoriques p. p. m. de l'élément d'analyse — p. p. m.$_T$ E. A.—étant obtenues en divisant les valeurs expérimentales — p. p. m.$_E$ E. A.—par le facteur F.

β) Mélanges ternaires des trois éléments d'analyse

Les valeurs expérimentales obtenues de chacun des éléments son affectées par l'influence partiale des deux éléments qui l'accompagnent en solution. On ne doit pas considerer des influences additives, mais on est arrivé près des résultats théoriques avec une précision suffisante, en faisant des corrections avec des facteurs calculés à partir des deux facteurs obtenues par les courbes de correction[1, 3].

5. Mode opératoire

a) Dissolution de l'échantillon

Attaquer 1 g d'acier dans un bécher par 60 ml ClH conc. Chauffer légèrement. Ajouter 30 ml NO_3H conc. Chasser les vapeurs nitreuses par chauffage. Concentrer par évaporation et ajouter de l'eau jusqu'à 100 ml. Filtrer la solution froide par un filtre sec. Laver. Concentrer jusqu'à 8 ml par évaporation sur une plaque métallique chauffée.

b) Acidité

Ajouter 15 ml ClH 12N. Porter jusqu'à 25 ml.

* Nous avons redigé des travaux plus détailles en ce qui concerne ces méthodes de correction[2, 3].

c) Extraction du fer

Passer à une ampoule à décanter (avec les 15 ml ClH, voir plus haut). Verser 25 ml de l'éther isopropylique. Agiter énergiquement pendant

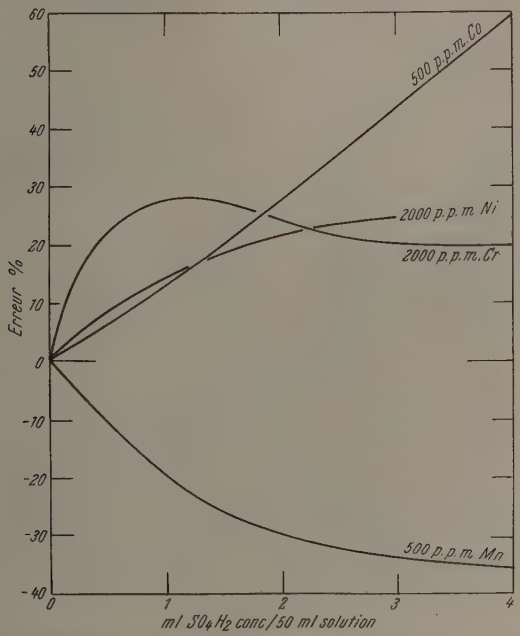


Fig. 10. Erreurs produites par des additions croissantes de SO_4H_2 conc. sur les éléments d'analyse

15 minutes. Décanter. Recommencer l'opération après avoir evaporé, et reglé l'acidité. Chasser l'excès de l'éther de la couche aqueuse séparée. Porter à 100 ml.

d) Séparation du nickel

On prend 50 ml (avec des échantillons de petite teneur on peut prendre 100 ml). Concentrer à 10 ml. Ajouter 0,5 g d'acide citrique et rendre la solution légèrement ammoniacale avec de l'ammoniaque conc. Ajouter 25 ml de solution de diméthylglyoxime (1% dans l'alcool). Si l'on doit répeter la précipitation, ajouter de nouveau l'acide citrique et l'ammoniaque après avoir décanté et dissous. Verser dans une ampoule a décanter et ajouter 30 ml de chloroforme. Agiter énergiquement pendant 2 minutes. Laver la couche chloroformique avec un volume égal d'ammoniaque (1 : 50). On peut faire d'extractions comme la précédente, avant de laver jusqu'avoir la couche chloroformique sans coloration. Agiter la couche chloroformique 3 fois avec 50 ml ClH 5N. Agiter la solution acide avec

20 ml de l'éther éthylique. Chasser l'éther. Minéraliser la solution avec 3 ml SO_4H_2 conc. et une quantité suffissante de NO_3H en petites portions. Reduire la volume par évaporation et chasser les vapeurs nitreuses jusqu'à apparitions de fumées blanches. Diluer jusqu'à 50 ml.

e) Dosage du nickel

Faire la détermination dans le photomètre.

f) Préparation de la solution des autres éléments

Joindre les couches aqueuses de l'extraction avec du chloroforme et la solution ammoniacale de lavage. Agiter avec 20 ml de l'éther. Chasser l'éther. Minéraliser comme décrit plus haut. Chauffer, chasser les vapeurs nitreuses et concentrer. Diluer jusqu'à 50 ml.

g) Dosages du Co, Cr et Mn

Faire les mesures dans le photomètre. Calculer les valeurs expérimentales par correction des mesures.

III. Résultats

Dans les tableaux V, VI et VII sont donnés quelques résultats obtenus avec des échantillons d'acier qui ont été analysés par les méthodes

Tableau V. Déterminations du nickel dans les aciers*

Échantillon	Pourcentage		Différences
	Voie Chimique	Photométrie	
1	0,68	0,61	— 0,07
		0,60	— 0,08
		0,62	— 0,06
		0,52	— 0,16
2	1,04	0,90	— 0,14
		1,17	0,13
		0,91	— 0,13
		1,11	0,07
3	2,32	2,13	— 0,19
		1,96	— 0,36
		1,95	— 0,37
		1,84	— 0,48
4	3,46	3,60	0,14
		3,42	— 0,04
		3,18	— 0,28
		2,88	— 0,58
		3,18	— 0,28
		3,18	— 0,28

* Ces résultats n'ont pas besoin de correction car ils sont obtenus après avoir séparé le nickel. Les diverses valeurs expérimentales correspondent à des échantillons différents.

décrites. Les valeurs expérimentales sont comparées avec celles obtenues par voie chimique.

Tableau VI. Déterminations du manganèse dans des aciers et dans des alliages ferro-manganèses

Échantillon	Pourcentage		Différences
	Voie Chimique	Photométrie	
4	0,70	0,64	— 0,06
		0,76	0,06
5 (F-M.)	47,5	45,5	— 2,0
		46,0	— 1,5
		44,0	— 3,5
		45,6	— 1,9
6 (F-M.)	77,9	66,7	— 11,2
		70,0	— 7,9
		64,8	— 13,1
		71,0	— 6,9

Tableau VII. Déterminations du Ni, Co, Mn et Cr dans les aciers

Échant.	Ni			Co			Mn			Cr		
	Pourcentages		Diff.	Pourcentages		Diff.	Pourcentages		Diff.	Pourcentages		Diff.
	V. C.	Ph.		V. C.	Ph.		V. C.	Ph.		V. C.	Ph.	
5	2,46	2,61	0,15				0,48	0,56*	0,08	0,70	0,48	—0,22
		2,46	0,0					0,48*	0,0		0,96*	0,26
		2,40	—0,06					0,57*	0,09		0,64*	—0,06
		2,40	—0,06					0,57	0,09		0,76	0,06
								0,57	0,09		0,76	0,06
								0,53	0,05		0,77	0,07
6				4,90	4,19	—0,71	0,42	0,52	0,10	4,75	4,37	—0,38
					4,30	—0,60		0,56	0,14		4,09	—0,66
					3,52	—1,38		0,68	0,26		4,50	—0,25
					5,65	0,75		0,70	0,28		4,73	—0,02
					4,28	—0,62		0,49	0,07		4,07	—0,68
					4,34	—0,56		0,49	0,07		4,39	—0,36

*Résultats non corrigés.

Les intervalles données dans le Tableau I nous permettent de faire des analyses jusqu'à teneurs très hautes des échantillons si on dissous 1 g d'acier et on porte jusqu'à 100 ml.

Les plus faibles concentrations mesurables sont a peu près 1% des limites superieures des séries d'étalons. Les meilleurs dosages seront ceux des échantillons compris entre l'étalon 1/1 et le 1/10. Les mesures des teneurs plus faibles sont obtenues avec des erreurs plus grandes que $\pm$ 10%.

IV. Discussion

Avec les méthodes décrites ci-haut on peut arriver a la détermination particulière et simultanée de quelques éléments fréquents dans les aciers par photométrie de flamme.

La précision et l'exactitude des résultats ne sont pas si parfaites que celles que l'on peut obtenir par voie chimique, mais les valeurs expérimentales ne dépassent pas dans les erreurs permises dans la photométrie de flamme. On a l'avantage de la rapidité des mesures et de pouvoir mettre au point des nombreuses analyses en série. On peut aussi limiter le nombre des séparations nécessaires à la préparation de l'échantillon dans quelques cas particuliers. (Aciers sans nickel on avec des très faibles teneurs de ce métal.)

On peut faire aussi des déterminations simultanées de divers éléments dans la même solution.

Les interférences très petites sont dues à d'autres facteurs, car l'effet de l'acidité chlorhydrique, est éliminée par l'acide sulfurique.

Les aciers contenant du vanadium, du molybdène et du tungstène seront studiés (ultérieurement).

Résumé

On a étudié les possibilités de l'usage du photomètre de flamme pour la détermination quantitative de quelques éléments fréquents dans diverses alliages ferreuses. Parmi ces éléments on a étudié spécialment le cobalt, le nickel, le chrome et le manganèse. La sensibilité de ces éléments dans les méthodes de photométrie de flamme est petite et leur émissions sont affectées par la grande concentration du fer des échantillons, même dans les aciers avec des teneurs élevées de nickel et de chrome. On doit donc faire une séparation préalable du fer, que nous avons effectuée par extraction avec des solvants organiques, ayant étudié de même les récupérations quantitatives des autres métaux dans les solutions privées de fer. D'autre part on a étudié les interférénces mutuelles de ces éléments pour arriver à des conclusions sur les erreurs que peuvent apparaître on cours des mesures. On discute aussi la séparation préalable du nickel et les modes opératoires. Quelques résultats sont donnés sur l'analyse de divers échantillons d'acier et de ferromanganèse. Les différences entre les valeurs photométriques et obtenues par voie chimique sont aussi indiquées.

Zusammenfassung

Die Möglichkeit der Verwendung der Flammenphotometrie zur quantitativen Bestimmung einiger Elemente, die sich häufig in Eisenlegierungen finden, wurde untersucht. Besonders Kobalt, Nickel, Chrom und Mangan wurden hierbei in Betracht gezogen. Die Empfindlichkeit der Flammenphotometrie für diese Elemente ist gering. Deren Emission wird durch hohe

Eisenkonzentrationen beeinträchtigt, auch wenn der Gehalt an Nickel und Chrom im Stahl beträchtlich ist. Daher muß das Eisen vorher abgetrennt werden. Dies wurde durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt, da festgestellt werden konnte, daß sich die übrigen Elemente in den von Eisen befreiten Lösungen quantitativ auffinden lassen. Weiters wurde die gegenseitige Störung dieser Elemente untersucht, um auf allenfalls dadurch bedingte Fehler aufmerksam zu werden. Die vorhergehende Abtrennung des Nickels und die dazu geeigneten Methoden werden erörtert. Einige Analysenergebnisse von verschiedenen Stählen und Mangan-Eisen-Legierungen werden angeführt. Die sich zwischen photometrischer und chemischer Analyse ergebenden Differenzen werden angegeben.

Summary

A study has been made of the use of the flame photometer for determining quantitatively some of the elements found in various ferrous alloys. Among these elements, special studies have been made of cobalt, nickel, chromium, manganese. The sensitivity by the high concentration of iron in the samples, even in steels containing much nickel and chromium. Consequently, the iron should be removed beforehand. The writers accomplished this by extraction with organic liquids, after they studied the quantitative recovery of other metals in solutions freed of iron. A study has also been made of the mutual interferences of these elements to arrive at conclusions regarding the errors which may appear during the course of the measurements. A discussion is given of the preliminary separation of nickel and the procedures. Analyses of different samples of steel and ferromanganese are reported. The differences between the photometric values and those obtained by chemical methods are also pointed out.

Bibliographie

[1] *M. C. Asunción-Omarrementería*, Thèse, Faculté de Sciences, Univ. Madrid. (En préparation.)

[2] *F. Burriel-Martí* et *J. Ramírez-Muñoz*, Photométrie de flamme. Rapports du C. S. I. C. de Espagne. (À paraître.)

[3] *F. Burriel-Martí* et *J. Ramírez-Muñoz*, Quim. e Industria. (À paraître.)

[4] *F. Burriel-Martí*, *J. Ramírez-Muñoz* et *E. Fernandez-Caldas*, Analyt. Chemistry **25**, 583 (1953).

[5] *F. Burriel-Martí*, *J. Ramírez-Muñoz* et *E. Fernandez-Caldas*, An. Edaf. y Fisiol. Veg. **13**, 35 (1954).

[6] *C. R. Gerber*, *N. H. Ishler* et *E. Borker*, Comm. pour le «2nd Pittsburg Conference on Anal. and Appl. Spectroscopy» (1951). Résumé dans Analyt. Chemistry **23**, 684 (1951).

[7] *P. T. Gilbert*, Beckman Instruments Inc., Reprint R-56 (1952).

[8] *D. F. Kuemmel* et *H. L. Karl*, Analyt. Chemistry **26**, 386 (1954).

[9] *H. J. Noebels*, Beckman Instruments Inc., Reprint R-60 (1954).

[10] *J. Ramírez-Muñoz*, Répresentations logarithmiques, 2e Ed. Madrid: Paraninfo. 1954.

[11] *R. A. Wolfe* et *R. G. Fowler*, J. Opt. Soc. Amer. **35**, 86 (1954).

Aus dem Institut für allgemeine und angewandte Geologie und Mineralogie der Universität München

Zur Spektralanalyse kleiner Substanzmengen

Von

Ekkehard Preuss

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 16. Mai 1955)

Einleitung

Für die verschiedenen Aufgaben der spektrochemischen Analyse wurden verschiedene Anregungsarten entwickelt. Die Analyse nichtleitender Stoffe (Gesteine und Minerale) wird vor allem im Gleichstrombogen zwischen Kohleelektroden durchgeführt. Die ältere Anordnung, die Substanz aus der Anode des Kohlebogens zu verdampfen, hat den Vorteil, größere Substanzmengen auch hochsiedender Stoffe zur Analyse zu bringen. Dagegen bedarf die von *Mannkopff* und *Peters*[1] entwickelte Verdampfung aus der Kathode des Kohlebogens (Glimmschichtmethode, auch Kathodenschichtmethode) nur wesentlich geringerer Substanzmengen, denn durch den charakteristischen Anreicherungseffekt werden selbst sehr kleine Mengen nachweisbar. Die für einen Nachweis erforderlichen Mindestmengen betragen für die meisten Metalle 0,01 bis 0,001 μg, bei einigen auch weniger. Da im allgemeinen 1 bis 3 mg Substanz verwendet werden, ist die Konzentrationsempfindlichkeit sehr hoch. Eine Erhöhung der Konzentrationsempfindlichkeit ist durch Kombination z. B. mit einer fraktionierten Verdampfung[2, 3] möglich. Wenn andererseits sehr geringe Substanzmengen quantitativ untersucht werden sollen, so ist diese Glimmschichtmethode ebenfalls am geeignetsten.

Aufgabe

Die Untersuchung eines Meteoriten[4] erforderte eine sorgfältige Prüfung der Glimmschichtmethode, ob sich die sehr kleinen Mineralkörnchen von Nickeleisen, Troilit und Olivin trotz ihrer Größe von etwa 0,1 bis 0,2 mm einzeln untersuchen lassen. Eine Anreicherung der Mineral-

komponenten sollte nicht erfolgen, um jede Verunreinigung auszuschließen. Außerdem sollte das Material zu einer sehr großen Zahl von Aufnahmen ausreichen, damit auch eventuelle Unterschiede zwischen gleichen Komponenten bemerkt werden. Auch sollte eine Zerkleinerung der einzelnen Körner vor der Aufnahme unterbleiben.

Da diese Körner verschiedene Größen haben, ist die erste Forderung für reproduzierbare Aufnahmen, nämlich die nach Anwendung gleicher Substanzmengen, nicht erfüllt. Es mußte deshalb geprüft werden, wieweit Reproduzierbarkeit möglich ist. Die folgenden Ausführungen bringen die Erfahrungen, die bei der Untersuchung dieser speziellen Aufgabe gemacht wurden.

Aufnahme sehr kleiner Substanzmengen mit der Kathodenschichtmethode

Die Aufnahmen wurden mit einem großen Quarzspektrographen gemacht, um den Untergrund gegenüber den Linien möglichst zu verringern. Die übliche Art der Bogenaufnahmen mit der Kathodenschichtmethode ist mehrfach beschrieben[5]. Für die Aufnahme der angegebenen kleinen Substanzmengen mußte diese Technik entsprechend abgewandelt werden.

Kohleelektroden

An die Reinheit der Kohleelektroden werden höchste Anforderungen gestellt. Die nach dem Verfahren von *Bauer* und *Hörmann*[6] gereinigten Kohlen werden mechanisch auf die gewünschte Form gebracht (oberer Durchmesser 3 mm, mit Bohrung 1 mm tief, ½ mm weit). Die unvermeidlichen Verunreinigungen z. B. durch den Zimmerstaub werden kurz vor dem Füllen der Bohrung durch einen stromstarken Bogen beseitigt, eine unbedingt notwendige Maßnahme, um letzte oberflächliche Spuren von Ca, Mg, Fe, Cu und Si zu vertreiben[7].

Substanz

Die kleinen, nicht zerkleinerten Körnchen werden unter dem Präpariermikroskop ausgesucht und mit einer Nadel in die Bohrung der Kohleelektrode gefüllt. Die Gewichtsbestimmung erfolgt durch Ausmessen oder Wägen. Pulverförmige Eichmischungen werden eventuell mit einer Spur Kohlepulver verdünnt und eingefüllt. Lösungen von ca. 1 μl können mit den üblichen Mikropipetten bequem auf die Spitze der doppelt ausgeglühten Kohlen gebracht werden. Diese Lösungen können sowohl als Eichlösungen anfallen als auch bei der selektiven Auflösung einzelner Körnchen erhalten werden.

Die Emissionsverteilung in der Kathodenschicht

Die sehr geringen Substanzmengen beeinflussen den Bogen zwischen Kohleelektroden nicht wesentlich, dagegen kommt der „Glimmschicht-

Effekt" sehr deutlich zur Ausbildung. Im Bogenkern leuchten die Bogengase und nur die wenigen Metalle, die eine ausreichend hohe Ionisierungsspannung aufweisen. Metalle mit niedrigerer Ionisierungsspannung sind entsprechend nur in den äußeren und kathodennäheren Gebieten angereichert und zu beobachten. Für sehr leicht anregbare Metalle, z. B. für Kalium (Ionisierungsspannung 4,7 V), liegt die günstigste Anregung in einer Bogenzone von ca. 3000°, d. h. also schon unterhalb der Kathodenspitze. Aus der Lage der Linien läßt sich demnach auf ihren Anregungszustand schließen. Bei der Abbildung der Lichtquelle muß also beachtet werden, daß die Linien der verschiedenen Elemente je nach der Anregungsspannung an verschiedenen Stellen im Bogen leuchten.

Abbildung des Bogens

Der Bogen wird etwa dreifach vergrößert auf den Spalt abgebildet. Dabei muß besonders darauf geachtet werden, daß auch die Kathodenspitze und die Teile neben dieser auf den Spalt kommen, wozu sich sphärozylindrische Linsen besonders bewähren. Von den 10 mm Bogenlänge werden nur die 2 bis 3 mm über und 1 bis 2 mm unter der Spitze verwendet. Die Abbildung auf die Optik wurde nur in den Fällen angewandt, wo eine Schwärzungskurve mit einem rotierenden Sektor gewonnen werden sollte.

Auswertung der Spektralaufnahmen

Die Gehalte wurden nach dem Verfahren der homologen Linien geschätzt, zum Teil durch photometrische Ausmessung der Schwärzung bestimmt.

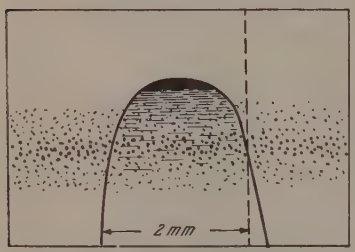


Abb. 1. Emissionsverteilung der Linie Kalium 4043/47 vor der Kathode bei 9 A (gepunktet). Auf den Spalt abgebildeter Teil des Bogens gestrichelt - - -)

Bestimmung des Kaliums

Als besonders schwierig erwies sich wider Erwarten die Bestimmung sehr kleiner Kaliummengen in Feldspat. Infolge der sehr niedrigen Ionisierungsspannung ist Kalium im Bogen schon bei geringen Temperaturen vollständig ionisiert. Es wird deshalb nicht mehr über, sondern schon unter der Kathodenspitze beobachtet. Deshalb wurde der Bogen so abgebildet, daß die Zone *neben* der Kathodenspitze auf den Spalt fällt (Abb. 1).

Der qualitative Nachweis

Der qualitative Nachweis ist bis zu sehr geringen Absolutmengen möglich. Dabei ist es vorteilhaft, wenn die Substanz in kurzer Zeit ver-

dampft, damit der Untergrund im Verhältnis zur Linie nicht zu stark wird.

So beträgt z. B. die geringste Nickelmenge, die bei einer Spaltbreite von 30 μ und einer Belichtungszeit von 30 sec unter den gegebenen Bedingungen (lichtschwacher, großer Quarzspektrograph) nachweisbar ist, für die Linie:

3045,01 A	1,5	μg Ni/30 sec
3064,62 A	0,2	μg Ni/30 sec
3054,32 A	0,04	μg Ni/30 sec
3050,82 A	0,008	μg Ni/30 sec

Dabei wird die Glimmschicht in die Optik abgebildet. Wird sie auf den Spalt abgebildet, sind die Mengen noch geringer.

Die bei „Makro"aufnahmen verwendeten Nachweislinien müssen für die Untersuchungen geringster Substanzmengen nochmals überprüft werden, da infolge der höheren Bogentemperaturen Funkenlinien wesentlich stärker als Bogenlinien erscheinen.

Die günstigsten Nachweislinien, die bei einer Prüfung des sichtbaren und des UV-Spektrums (bei einer Dispersion des Glasspektrographen 6 bis 15 A/mm, des Quarzspektrographen 2 bis 10 A/mm) gefunden wurden, sind:

Na I	3302 A	0,005 μg
K I	4044 A	0,1 μg
Mg II	2795 A	$<$ 0,001 μg
Cr I	2677 A	
V I	3284 A	
Mn I	2794 A	0,0005 μg
Co	3453 A	0,005 μg
Ni	3050 A	0,002 μg
Cu I	3247 A	
Ga	2943 A	
Ge	2651 A	0,01 μg
Sn	3175 A	
Pb	2833 A	

Die quantitative Bestimmung, insbesondere der Einfluß der Selbstabsorption

Die quantitative Bestimmung erfolgt allgemein durch den Intensitätsvergleich von zwei Spektrallinien. Diese müssen eine gewisse Mindestintensität haben, wenn der Fehler der Photometrierung nicht zu groß werden soll. Während man bei den gewöhnlichen „Makroaufnahmen" mit mehreren mg Substanz genügend Linien zur Auswahl hat, ist dies bei den „Mikroaufnahmen" nicht mehr der Fall. Es müssen auch die stärkeren Linien herangezogen werden, die bei „Makroaufnahmen" vermieden

werden, da sie durch Selbstabsorption und Selbstumkehr geschwächt und deshalb konzentrationsunempfindlich werden.

Deshalb mußte untersucht werden, wie weit die Selbstabsorption auch bei den geringen Substanzmengen von wenigen μg noch zu Störungen Anlaß gibt. Dabei zeigte sich, daß noch eine deutlich merkbare Selbstabsorption eintritt. Dies hat vor allem seinen Grund darin, daß die Substanz in der Kathodenschicht in wenigen $^1/_{10}$ mm Höhe angereichert ist und in kurzer Zeit verdampft. Diese Selbstabsorption wäre ohne störenden Einfluß und ließe sich eliminieren, wenn die bei jeder Aufnahme verwendeten Substanzmengen gleich wären und auch unter den gleichen Bedingungen aufgenommen würden. Es schwankt aber die Intensität der zur Photometrierung ausgewählten Linien höherer Intensität, da 1. die Substanzmengen wechseln (verschiedene Körnchengröße) und 2. ungleichmäßige Verdampfung beobachtet wird. Z. B. zeigen Aufnahmen von einem Mineralkörnchen und von der gleichen Menge Pulver gemischt mit etwas Kohlepulver verschiedene Intensitätsverhältnisse, da die Verdampfung verschieden erfolgt. Entsprechend der von *W. Gerlach* und *Schweitzer* in dem „Fixierungspaar" festgelegten Idee, die Gleichartigkeit der Aufnahme an dem Intensitätsverhältnis bestimmter Spektrallinien zu prüfen und danach die Arbeitsvorschrift festzulegen, muß jetzt auch die Selbstabsorption zur Charakterisierung der Aufnahmebedingungen herangezogen werden.

Hierdurch kann die mittlere Konzentration, d. h. die Dampfdichte im Bogen, beschrieben werden. Ähnlich wurde auch versucht, die Temperatur durch den „Anregungswert"[8] anzugeben.

Die Messung des Selbstabsorptionswertes an Multipletts

Der Betrag der Selbstabsorption läßt sich an Multipletts, speziell an Dubletts vorzüglich bestimmen. Über Linienabsorption und Gesamtabsorption der Kupferresonanzlinien sowie über die Intensität der Resonanzlinien in Abhängigkeit von der Konzentration berichten Arbeiten von *Schnautz* und *Mannkopff*[9, 10]. Sie zeigen, daß das Intensitätsverhältnis I_1/I_2 zweier Spektrallinien eines Dubletts (Kupfer) mit zunehmender Konzentration von 0,005 bis 0,5% abnimmt von 2 bis fast 1. Der Grenzwert 2 wurde im Bogen nur bei sehr geringen Konzentrationen erreicht.

Das Intensitätsverhältnis gibt uns also ein Maß für die Dampfdichte. Wenn beispielsweise sehr geringe Substanzmengen verdampfen, so erhält man Dublettlinien von geringer Intensität. Trotzdem wird das Intensitätsverhältnis je nach der Verdampfungszeit verschieden sein. Es kann bei sehr schneller Verdampfung nahe an 1 liegen.

Diese Bestimmung des Selbstabsorptionswertes ist nicht nur für die „Mikroaufnahmen" wichtig, sie kann auch bei den „Makroaufnahmen" wichtig werden. Denn sobald eine fraktionierte Verdampfung der ein-

zelnen Komponenten eintritt, wird auch die Verdampfungszeit wichtig. So gibt Hg, daß aus einer flachen Bohrung verdampft wird, infolge seiner kurzzeitigen hohen Dampfdichte eine schwache, allerdings verbreiterte Linie, bei einer tiefen Bohrung dagegen verdampft die gleiche Menge in einem längeren Zeitraum und gibt deshalb stärker geschwärzte Linien.

Bestimmung der Eichkurve aus dem Dublettverhältnis

Die Verwendung des Dublettverhältnisses zur Bestimmung und Kontrolle der Eichkurve ist bekannt. Werden z. B. aus verschiedenen Eichproben 2 Eichkurven für die 2 Linien eines Dublett gewonnen, so ist der Abstand der beiden Kurven, gemessen auf der Konzentrationsachse im ganzen Intensitätsbereich gleich. Z. B. im Falle des Kupfers (3247 und 3274) = 2 entsprechend dem Gewicht der beiden Linien.

Es liegt andererseits nahe, die Bestimmung der Konzentration dadurch zu versuchen, daß man aus dem Dublettverhältnis auf die Substanzmenge schließt, also gewissermaßen die „*Gouy*sche" Kurve[9, 10] benutzt. Dies ist aber bei der Bestimmung kleiner Körner wegen der wechselnden Verdampfungsgeschwindigkeit und des dadurch wechselnden Dublettverhältnisses nur mit Vorbehalt möglich.

Die Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses von der Substanzmenge am Beispiel der Nickel- und Eisenbestimmung

Wenn keine Multipletts gemessen werden können, müssen andere, für die photometrische Messung günstige Linien im Spektrum gesucht werden. Unter anderem sollten die Nickelgehalte in den Nickel- und Eisenmeteoriten (kleine Körnchen von 1 bis 50 μg) bestimmt werden, deren Gehalte bei 5 bis 50% Nickel liegen. Deshalb wurden mehrere Nickel- und Eisenlinien sowohl in Meteoreisen wie auch in Nickel-Eisen-Legierungen und in Nickel-Eisen-Lösungen gemessen.

Abb. 2 zeigt im unteren Teil die Abhängigkeit der Intensität ($Y = \log I$) von der Menge des Nickels in der auf die Kohlespitze gegebenen Lösung. Diese Menge verdampft in 30 Sekunden. Die Intensitätszunahme wird wie erwartet bei größeren Substanzmengen immer geringer. Deshalb wurde im oberen Teil das Intensitätsverhältnis angegeben, das bereits bei der geringen Menge von 1 μg deutliche Abnahme zeigt. Die Y-Kurven laufen anfangs unter 45°, doch nur einige Linien behalten diese Steigung bis zu höheren Mengen. Deshalb wurden in Abb. 3 u. 4 Messungen an verschiedenen, zwischen 1 und 25 μg wiegenden Nickel- und Eisenkörnern einer künstlichen Legierung so aufgetragen, daß Ni 3097 Å bzw. Fe 3040 Å einen geraden Anstieg gibt. Als Abszisse wurde z. B. die Intensität von Nickel 3097 Å gewählt, da eine ausreichend genaue Bestimmung der Substanzmenge nicht möglich war. Die Kurven zeigen, daß vor allem die Linie

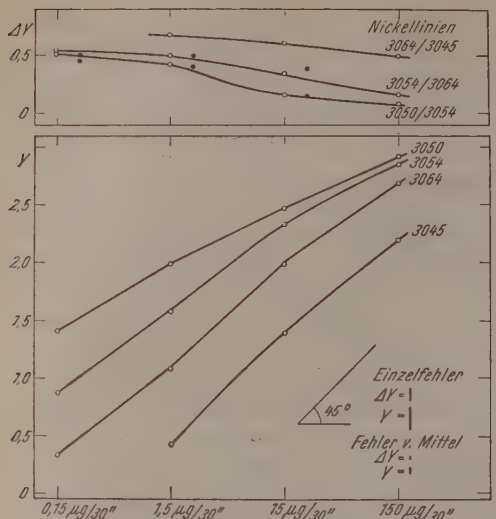


Abb. 2. Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses (Y) und der Intensität (Y) einiger Nickellinien von der Menge. Kohlebogen 9 A; Kathode 3 mm ∅; Abbildung auf Optik; Lösung

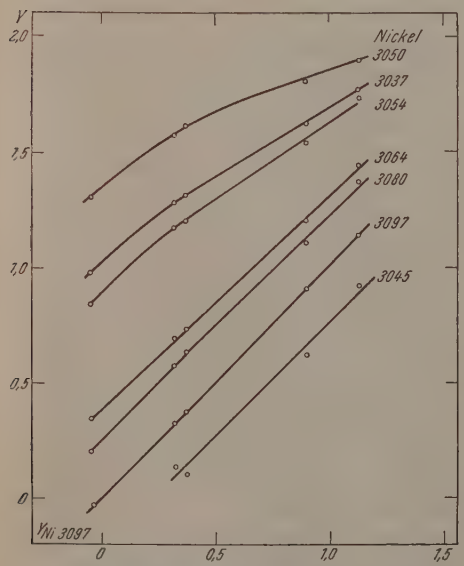


Abb. 3. Intensitätskurve für Nickellinien aus 5 Ni-Fe-Legierungen mit ca. 1—25 µg Ni

Nickel 3050 schon bei sehr kleinen Mengen über 1 µg nicht mehr den erwarteten Intensitätsanstieg zeigt. Das gleiche wurde in Abb. 4 für einige Eisenlinien im gleichen Spektralgebiet gefunden. Der Vergleich der Abb. 3 und 4 zeigt, daß für die Gehaltsbestimmung nur Nickel- und Eisenlinien verwendet werden können, die auf eine Änderung der Substanzmenge in gleicher Weise ansprechen.

Um Eichkurven für die Nickel-Eisen-Bestimmungen zu erhalten, muß also die Substanzmenge und auch die mittlere Verdampfungszeit berücksichtigt werden. Dies ist in Abb. 5 erfolgt, in der die verschiedenen Nickelgehalte bzw. Nickel- und Eisenverhältnisse für 10 bis 30 µg Gesamtsubstanz auf getragen sind. Die Intensität der verschiedenen Eisenlinien, die aus den Eichaufnahmen erhalten wurde, ist als Ordinate gewählt und die Intensität der Nickellinien bei den verschiedenen Gehalten darin eingetragen. Infolge der nach einer linearen Zunahme des Nickel-Eisen-Verhältnisses gewählten Abszisse steigt die Intensitätskurve für die schwächeren Nickellinien etwa unter 45°. In gleicher Weise wurden die Kurven für kleinere und größere Substanz-

mengen bestimmt, die von der Kurve Abb. 5 abweichen. Welche der Eichkurven jeweils zur Auswertung verwendet werden müssen, wird aus dem Intensitätsverhältnis der Eisenlinien zueinander leicht erkannt. Es tritt gewissermaßen das Intensitätsverhältnis der verschiedenen Eisenlinien an die Stelle des Dublettverhältnisses. Beide dienen also zur Angabe des Selbstabsorptionswertes.

Die Selbstabsorption und Selbstumkehr der Linien wurde bei späterer Gelegenheit an Gitteraufnahmen geprüft, die eine Auflösung von 0,05 Å haben. Dabei zeigte sich, daß einige sehr schwache Eisenlinien, die bei den üblichen Aufnahmen im Quarzspektrographen nichts Auffälliges zeigen, deutlich selbstumgekehrt sind.

Nach der Prüfung der verschiedenen Linien in der oben angegebenen Weise ist es dann leicht, bestimmte Linienpaare für eine Gehaltsbestimmung herauszusuchen, die bei den Serienanalysen gemessen werden.

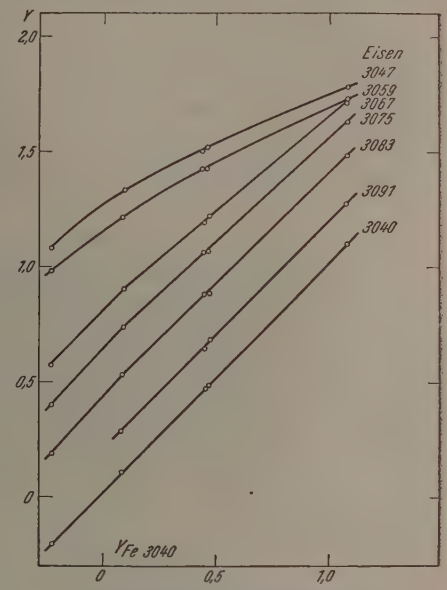


Abb. 4. Intensitätskurven für Eisenlinien aus 5 Ni-Fe-Legierungen mit ca. 2—50 μg Fe

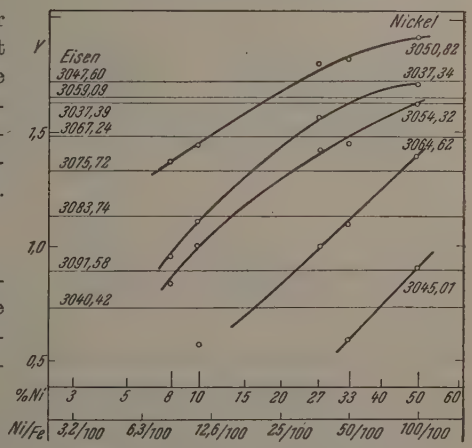


Abb. 5. Eichkurven für Nickel in Eisen bei Verdampfung von 10—30 μg Substanz innerhalb 30 sec

Zusammenfassung

Die qualitative und quantitative spektrochemische Analyse kleiner Substanzmengen, z. B. von Mineralkörnern in der Größenordnung von 1 bis 30 μg, ist durch die Kathodenschichtmethode nach

Mannkopff und *Peters* möglich. Die qualitative Analyse erfordert eine Abbildung des Bogens, die die speziellen Leuchteigenschaften der verschiedenen Elemente in der Kathodenschicht beachtet. Die quantitative Analyse verlangt verschiedene Eichkurven, um die verschiedene Selbstabsorption der zur Gehaltsbestimmung verwendeten Linien auszugleichen. Diese Unterschiede werden durch die wechselnde Substanzmenge und eventuell wechselnde Verdampfungsgeschwindigkeit bedingt. Zur Kontrolle dieser Verhältnisse empfiehlt sich die Bestimmung eines Selbstabsorptionswertes, am besten aus dem Vergleich von Multipletts, der über die (mittlere) Dampfdichte Auskunft gibt.

Summary

It is possible to make qualitative and quantitative spectrochemical analyses of small samples, for instance of grains of minerals of the order of 1 to 30 μg, by the cathode arc layer method of *Mannkopff* and *Peters*. The qualitative analysis requires a projection of the arc, which takes account of the special luminous properties of the various elements in the cathode layer. The quantitative analysis requires various calibration curves to compensate the diverse self-absorption of the lines used for determining the content. These differences are conditioned by the variation in the amount of substance and in some cases by the variation in the rate of volatilization. To control these relationships, it is advised to determine a self-absorption value, and this is best accomplished by means of a comparison of the multiplets, which yield information regarding the (mean) vapor density.

Résumé

L'analyse spectrochimique qualitative et quantitative de faibles quantités de substances, telles que des grains de minerais de 1 à 30 μg peut être effectuée suivant la méthode de la couche cathodique de *Mannkopf* et *Peters*. L'analyse qualitative exige une image de l'arc qui tienne compte des propriétés émissives des différents éléments dans la couche cathodique. L'analyse quantitative est basée sur différentes courbes d'étalonnage pour compenser l'auto-absorption des raies utilisées pour le dosage. Les différences d'auto-absorption résultent des quantités variables de matière et éventuellement de la vaporisation plus ou moins facile. Pour le contrôle de ces rapports la mesure d'un coefficient d'auto-absorption s'impose, de préférence par comparaison de multiplets qui donne des renseignements sur la densité de vapeur.

Diskussion

H. *H. Svejda* (Wien): Erfolgt die Photometrierung mit einem gewöhnlichen Spektrallinienphotometer?

H. *E. Preuss:* Nein, mit dem besten, nämlich dem Zeiss'schen Spektrallinienphotometer.

H. *H. Svejda:* Ist vielleicht versucht worden, mit der s. p. d.-Skala nach *Addink* zu messen? Da es sich um geringe Substanzmengen handelt, also die für die Skala notwendigen Bedingungen vorliegen, könnte man sich vorstellen, daß diese einen großen Vorteil bietet. Liegen hierüber Erfahrungen vor?

H. *E. Preuss:* Die s. p. d.-Skala ist hier zweifellos wesentlich geeigneter als die etwas mühsame Photometrierung. Aber ich muß gestehen, daß meine Arbeiten schon etwas weiter zurückliegen.

H. *H. Svejda:* Ich möchte dazu bemerken, daß ich bei Abbildung auf dem Spalt manchmal keilförmige Linien bekommen habe, und ich muß sagen, daß ich mit der s. p. d.-Skala wesentlich bessere Resultate erzielen konnte als mit einem Photometer.

H. *E. Preuss:* Vielleicht darf ich zu dieser Sache ganz kurz ein charakteristisches Beispiel anführen. Bei der Quecksilberbestimmung erhalten Sie eine sehr breite und schwache Quecksilberlinie, wenn es sehr schnell verdampft. Sie können aber auch eine sehr scharfe und äußerst starke Linie von genau der gleichen Menge je nach der Verdampfungsgeschwindigkeit bekommen. Beides ist also eine Folge der Absorption, d. h. die momentane Dampfdichte im Bogen ist von durchaus beachtlichem Einfluß, wenn man mit solchen extremen Verhältnissen arbeitet.

H. *N. W. H. Addink* (Eindhoven): Ich meine, es ist doch wichtig zu beachten, ob wir mit sehr geringen, geringen oder weniger geringen Mengen arbeiten. Z. B. gibt das Buch von Stock „The Cathode Layer Analysis" ein Bild, wie man stets die Kathodenschicht sehen kann. Sie haben hier gezeigt, daß man bis auf 20 oder 30 μg gehen kann. Man kann dann, wie auch wir unsere Proben ausgeführt und wie ich es heute morgen dargelegt habe, ganz genau mit dieser Glimmschichtmethode arbeiten. Wir begannen, mit 0,1 oder 0,2 mg zu arbeiten. Anfangs war ich auch unsicher, ob der Glimmschichteffekt wieder auftreten würde, aber ich habe ihn niemals bemerkt. Ich meine, man muß sich genaue Vorstellungen darüber machen, daß die Quantität der Probe von großer Bedeutung ist.

H. *E. Preuss:* Jawohl, auch bei 100 μg müßten wir den Effekt schon bekommen. Allerdings sitzt dann die Gassäule nicht mehr direkt auf und wir erhalten eine Schicht von Elementen von niederer Temperatur, die auch vor der Kathode sind. Der hier gezeigte Fall mit den kleinen Hörnchen tritt nur bei sehr geringen Substanzmengen auf. Aber gerade dann erscheint mir die Glimmschichtmethode besonders nützlich. Im Gegensatz zu Ihrer Methode, die als Universalmethode für Mengen von einigen Milligramm dienen soll, ist hier die Anode richtig. Man kann auf der Kathode niemals so viel verdampfen, besonders wenn man Graphit als Kathode verwendet, der die Wärme rasch ableitet. Hier wurde jedenfalls Kohlenstoffkohle verwendet.

H. *N. W. H. Addink:* Haben Sie die Form der Excitationsregion schon in etwa festgestellt?

H. *E. Preuss:* Man könnte sie feststellen, indem man den Bogen durchdreht und mit dem Auge die einzelnen Linien beobachtet. Das ist vielleicht das Schnellste. Bei einem großen Spektrographen kann man den Bogen auf den breiteren Spalt ganz verkleinert abbilden.

H. *A. Thiard* (Wien): Haben Sie eine Anreicherung von Spurenelementen vorgenommen, beispielsweise nach *Gorbach* und *Pohl* durch Chloroformextraktion, oder eine Entfernung von Hauptelementen wie Eisen?

H. *E. Preuss:* Es war hier speziell vorgesehen, alle weiteren Manipulationen zu vermeiden, wenn mit einer Menge von 0,1 μg bzw. in dieser Größenordnung begonnen wurde.

H. *A. Thiard:* In diesem Fall ist es also nicht notwendig?

H. *E. Preuss:* Notwendig ist eine Anreicherung erst dann, wenn man über einige Zehntel Milligramm kommt oder wenn es sich um noch größere Mengen handelt; dann würden die übrigen Elemente stören.

Literatur

[1] *R. Mannkopff* und *Cl. Peters*, Z. Physik **70**, 444 (1931).
[2] *E. Preuß*, Z. angew. Mineral. **3**, 8 (1940).
[3] *K. H. Wedepohl*, Geochim. Cosmochim. Acta **3**, 93 (1953).
[4] *E. Preuss*, Fortschr. Mineral. **28**, 63 (1949).
[5] *R. L. Mitchell*, The Spectrographic Analysis of Soils, Plants and Related Materials. Commonw. Bur Soil Science, Techn. Comm. No. 44 (1948).
[6] *E. Preuss*, Chemie d. Erde **9**, 378 (1935).
[7] *E. Preuss*, Spectrochim. Acta **5**, 327 (1952).
[8] *E. Preuss*, Z. angew. Mineral. **1**, 167 (1938).
[9] *H. Schnautz*, Spectrochim. Acta **1**, 173 (1939).
[10] *R. Mannkopff*, Spectrochim. Acta **1**, 197 (1939).

Aus der Landwirtschaftlich-chemischen Bundesversuchsanstalt in Wien

Über die Bestimmung der Spurenelemente in der Agrikulturchemie

Von

H. Schüller

Mit 1 Abbildung

(Eingelangt am 27. Mai 1955)

Die wachsende Bedeutung der Spurenelemente für die Landwirtschaft hat die Entwicklung geeigneter Methoden zu ihrer analytischen Erfassung notwendig gemacht. Die Spektralanalyse zeigt sich den üblichen chemischen Methoden hier weit überlegen, sei es, daß man auf dem Gebiet der Emission oder dem der Absorption arbeitet.

Die Gehalte, in denen die Spurenelemente in der Natur in Böden, Dünge- und Futtermitteln sowie Pflanzenaschen auftreten, reichen in Böden von 0,1% bei Mangan bis zu 10^{-8}% bei Molybdän. Als Einheit hat sich unter dem Einfluß der angelsächsischen Literatur das p. p. m., das ist ein Teil auf eine Million Teile, eingebürgert, wenn man auf 100 g bezieht, also 0,0001%. Dementsprechend ist der Bereich von 1000 p. p. m. bis 0,01 p. p. m. Gegenstand der Untersuchungen. Es ist ohne weiteres verständlich, daß so kleine Gehalte nicht direkt in den zu untersuchenden Proben festgestellt werden können, da die Hauptmengen, meist Kalksalze und Silikate, bei der Bestimmung stören würden.

Die Spurenanalyse hat sich daher in folgende drei Hauptteile zu teilen:

1. Extraktion oder Lösung der zu untersuchenden Probe;
2. Anreicherung der Spurenelemente, falls deren Anteil zu klein ist;
3. Bestimmung der Spurenelemente.

1. Bei Futtermitteln etwa wird die gesamte Menge der vorhandenen Spurenelemente interessieren. Meist handelt es sich bei Futtermitteln um Gemische von Kalksalzen mit Protein und fetthaltigen Substanzen, die noch Zusätze von Phosphaten aufweisen. Hier führt die Veraschung und nachfolgende Lösung etwa in Salzsäure zum Ziel. Die so erhaltene Lösung

ist Ausgangsprodukt der Anreicherung. Mitunter ist es möglich, Kupfer und Mangan in solchen Aschenlösungen direkt zu bestimmen. Man bedient sich dazu bekannter Farbreaktionen: bei Cu der Färbung mit Dithizon, bei Mn der Permanganatreaktion. Die anderen Elemente, wie Co, Ni, Zn, müssen angereichert bzw. von den Hauptmengen getrennt werden, was noch besprochen werden soll. Düngemittel sind teils aufgeschlossen, teils, wie Rohphosphat oder Thomasphosphat, schwerlösliche Körper. Hier wird man von einem vollkommenen Aufschluß Abstand nehmen, da ja die Pflanze nur die leichtlöslichen Anteile aufnehmen kann. Man stellt einen Extrakt her, etwa durch Lösen in Salzsäure und reichert in der Lösung die Spurenelemente an. Bei Böden stellt die Frage des geeigneten Extraktionsmittels des Hauptproblem dar, da ja die erste Forderung eines sinnvollen Extraktionsmittels die Erhaltung des Bodens in seiner Originalform ist. Hier entstehen auch die größten Schwierigkeiten der Anreicherung und Bestimmung, da notwendigerweise bei Verwendung sehr milder Extraktionsmittel nur wenig Spurenelemente in Lösung zu bringen sind, was sehr empfindliche Bestimmungsmethoden erforderlich macht.

2. Die Anreicherung der Spurenelemente aus den so erhaltenen Lösungen kann nach drei verschiedenen Methoden vorgenommen werden:

a) Fällungsmethoden;
b) Ausschüttelungsmethoden;
c) elektrochemische Anreicherung.

a) Diese Art der Anreicherung ist in umfassender und analytisch exakter Weise von *Mitchell* am Macaulay Institute für Soil Science in Aberdeen, Schottland, beschritten und zu einer vielgebrauchten Methode ausgebaut worden. *Mitchell* fällt die in Lösung gebrachten Spurenelemente mit Oxin bei bestimmtem p_H, filtriert die erhaltenen Oxinate und spektrographiert im Lichtbogen die Aschen. Die Methode ist sehr empfindlich und gestattet, Gehalte bis 0,01 p. p. m. exakt festzustellen.

b) *Pohl* schüttelt die Lösungen, die die Spurenelemente enthalten, mit einem Gemisch verschiedener komplexbildender Reagenzien (Na-Diäthyldithiocarbamat, Oxin und Dithizon) bei steigendem p_H mit Chloroform aus, wobei die Schwermetalle Komplexe bilden, die in Chloroform löslich sind. Nach der Verjagung des Chloroforms verascht man, löst die Asche in Salzsäure und spektrographiert im Funken.

c) Eine dritte Möglichkeit der Anreicherung besteht in der elektrochemischen Niederschlagung der Spurenelemente, die dadurch erleichtert wird, daß alle Spurenelemente edler sind als Eisen. Dieser Weg wurde wiederholt zur Lösung von Einzelproblemen beschritten, für die Analyse der Spurenelemente in der Landwirtschaft hat diese Methode bisher keine Bedeutung erlangt.

3. Die eigentliche Bestimmung der Spurenelemente kann prinzipiell auf zweierlei Art durchgeführt werden. Falls es sich darum handelt, ein oder zwei Elemente, etwa Cu und Mn, zu bestimmen, ist es vorteilhaft, eine Absorptionsmethode heranzuziehen. Im Falle des Mn, das ja schon den Übergang zu den Hauptnährstoffen bildet, ist die bekannte und bewährte Methode der Oxydation zu Permanganat und seine kolorimetrische Bestimmung der bequemste und genaueste Weg. Gehalte von 10^{-5}%, die Anreicherung mitgerechnet, können so bequem bestimmt werden. Niedrigere Gehalte festzustellen, ist mit anderen Farbkomplexen möglich, doch muß hier zu großer Vorsicht gemahnt werden, da kaum ein organischer Farbbildner für ein Element charakteristisch ist und Fehlmessungen durch andere Spurenelemente zu befürchten sind. Diese Schwierigkeiten umgeht die Bestimmung mittels der spektralen Emission.

An der Landwirtschaftlich-chemischen Bundesversuchsanstalt in Wien wird zur Zeit an der Ausarbeitung solcher Methoden gearbeitet. Das Hauptgewicht liegt zwar auf dem Gebiet der Bodenforschung, doch schließt dies nicht aus, in modifizierter Form auch die Spurenelementforschung in Dünge- und Futtermitteln zu betreiben. Bei Böden wird nach Extraktion in einem geeigneten Lösungsmittel — wir verwenden für 100 g Boden 500 ml Ammoniumacetatlösung und leiten zur Konstanthaltung des p_H Kohlensäure ein — die so erhaltene Spurenlösung nach der Ausschüttelungsmethode angereichert, die erhaltene Lösung der Metallkomplexe in Chloroform von diesem befreit, verascht und die Asche in 1 ml Salzsäure aufgenommen. Man hat so die in 100 g Boden enthaltenen Spurenelemente auf 1 ml Lösung konzentriert. Mit Ausnahme des Bors, das sich der chemischen Anreicherung auf die geschilderte Weise entzieht, können die Elemente Mn, Cu, Zn, Co, Ni, Mo, V, Cr, Pb, Sn und Ti sowie andere Elemente, wenn sie vom landwirtschaftlichen Standpunkt interessant erscheinen, bestimmt werden. Unter den in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Spektrographie von Lösungen hat sich die Methode mit bewegter Elektrode, die in die zu untersuchende Lösung eintaucht, als einfache und billige Aufnahmetechnik erwiesen[1]. Ein Rädchen aus spektralreiner Kohle, das von einem Kohlestab von 10 mm ⌀ durch Absägen mit einer Kreissäge auf der Drehbank leicht herstellbar ist, bildete den einen Pol der Funkenstrecke, während ein 1 cm langes Kohlestückchen, das in einem Halter aus rostfreiem Stahl steckt, die Gegenelektrode darstellt. An der Unterseite des Rädchens, das sich um eine horizontale Achse dreht, taucht dieses in die Untersuchungslösung ein. Zur Aufnahme wurde der große Quarzspektrograph von Hilger verwendet. Als Anregung wurde ein Funkenerzeuger nach *Feussner* mit 12.500 pF, $L = 0{,}8$ mH benützt. Der Elektrodenabstand betrug 3 mm. Als Bezugselement wurde Eisen verwendet, das den

Konzentraten in gleicher Menge nach der Anreicherung zugesetzt wurde. Da die in den Bodenextrakten enthaltenen Eisenmengen relativ klein sind, ist ein Fehler aus dieser Quelle nicht zu befürchten. Zur Messung hoher Schwärzungen wurde vor den Spalt ein Platinstufenfilter von 100 und 10% Durchlässigkeit gebracht. Man stellt nun Testlösungen bekannten Gehaltes her und erhält so für die einzelnen Spurenelemente nach dem üblichen Verfahren Eichlinien, an deren Hand man die unbekannten Proben durch Schwärzungsvergleich bestimmt. Die folgende Abbildung zeigt die so erhaltenen Eichkurven für Mn, Cu, Zn, Co, Ni

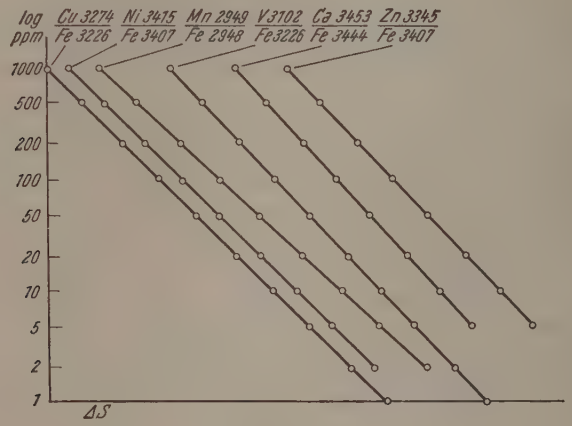


Abb. 1

und V. Zur Prüfung des Anreicherungsverfahrens wurden Bodenextrakte, die bereits von den Spurenelementen befreit waren, mit bekannten Mengen dieser Elemente versetzt und die Anreicherung, wie beschrieben, durchgeführt. Die Tabelle 1 zeigt die Reproduzierbarkeit bzw. die quantitative Erfassung der Spurenelemente durch das Ausschüttelungsverfahren.

Die Auswertung wurde nach dem leitprobengebundenen Verfahren durchgeführt, da bei den verschiedenen Einflüssen der Aufnahmetechnik nach dem Rädchenverfahren noch zu wenig Erfahrungen vorliegen, inwieweit von Platte zu Platte die Anregungsbedingungen konstant gehalten werden können, was ja für die Anwendung des leitprobenfreien Verfahrens Voraussetzung ist. Um bei kleinen Gehalten verläßlich messen zu können, wurde eine Transformation der Schwärzungen vorgenommen, wobei sich bei den Wellenlängen bis 3300 Å die P-Transformation, bei den Linien über dieser Wellenlänge die W-Transformation besser bewährt hat. Ebenso wurde bei kleinen Schwärzungen eine Untergrundkorrektur vorgenommen.

Tabelle 1

Zugesetzt p. p. m.	Wiedergefunden p. p. m.					
	Cu	Mn	Zn	V	Co	Ni
1000	920	1020	980	1030	990	1020
500	485	440	500	485	500	490
200	192	210	160	225	220	240
100	96	100	98	105	90	100
50	48	57	52	53	54	52
20	24	18	24	18	24	20
10	9,4	9,0	11	9,2	9,4	9,4
5	5,2	5,4	5,2	4,8	4,5	5,2
2	2,4	2,4		2,2		2,4
1	1,2			1,4		

Als Meßlinien wurden folgende Wellenlängen verwendet:

Mn ...2933, 2939, 2949, Fe 2948,
V 3102, 3185, 3226,
Cu....3247, 3226,
Zn....3345, 3407,
Co ...3405, 3453, 3407, 3444,
Ni ...3415, 3407.

Leider hat die so glatt verlaufende Aufstellung der Eichkurven, sowie die Prüfung des Anreicherungsverfahrens, nicht gehalten, was sie anfänglich versprochen hatten. Die Verteilung der einzelnen Spurenelemente in Bodenextrakten ist in ihren Gehalten recht verschieden.

Die in den mit Ammoniumacetat erhaltenen Bodenextrakten vorhandenen Spurenelemente bewegen sich in folgenden Größen:

	Extrakt p. p. m.	Konzentrat p. p. m.
Mn	10 —100	1.000—10.000
Cu	0,5 — 5	50— 500
Zn	1 — 10	100— 1.000
Ni	0,1 — 1	10— 100
Co	0,01— 0,1	1— 10
V	0,01— 0,1	1— 10

Der Faktor 100 zwischen Extrakt und Konzentrat erklärt sich aus dem Umstand, daß unsere Testlösungen auf 100 ml bezogen waren, während das Konzentrat 1 ml betrug.

Diesem Umstand muß Rechnung getragen werden, da durch die hohen Gehalte, namentlich an Mangan, die Elemente mit niedrigem Gehalte beeinflußt werden. Die zur Aufnahme der Eichkurven eingesetzten Testlösungsgemische müssen sich daher in den oben angegebenen Grenzen bewegen. Modellaufnahmen verschiedener Gemische von Testlösungen zeigen dies deutlich. Dabei wurde der Konzentrationsunterschied sehr kraß gewählt, um den Effekt deutlich zu machen. Es wurde jeweils ein Element konstant gehalten, während die fünf anderen in 10- und 100fachem Überschuß zugesetzt wurden.

Konstant p. p. m.	Überschuß	Δ8
	Mn, Zn, Co, Ni, V	
5	0	— 0,14, — 0,11
Cu 5	10fach	— 0,11, — 0,13
5	100fach	— 0,58, — 0,60
	Cu, Zn, Ni, V, Mn	
5	0	0,47, 0,50
Co 5	10fach	0,61, 0,63
5	100fach	— 0,98, — 0,99
	Cu, Mn, Co, Ni, V	
5	0	0.64, 0,71
Zn 5	10fach	0,32, 0,32
5	100fach	— 0,48, — 0,48
	Cu, Zn, Co, Ni, V	
5	0	0,41, 0,36
Mn 5	10fach	0,41, 0,42
5	100fach	0,08, 0,07
	Cu, Mn, Zn, Co, Ni	
5	0	— 0,06, — 0,08
V 5	10fach	0,04, 0,00
5	100fach	0,10, 0,13

Auf Grund obiger Erfahrungen wurden zur Bestimmung der Spurenelemente in Bodenextrakten die Testlösungen hinsichtlich ihrer Gehalte auf die zu erwartenden Grenzen abgestimmt. Die folgende Tabelle zeigt die Analysenresultate der Spurenelemente in Bodenextrakten mit Wiederholung:

	Mn	Cu	Zn	Ni	Co	V
B	31,2	0,85	4,80	0,51	0,05	0,10
	28,4	0,79	4,20	0,49	0,05	0,10
C	42,5	0,72	3,50	0,50	0,03	0,09
	46,3	0,68	3,20	0,50	0,03	0,08
L	62,4	0,32	2,80	0,31	0,01	0,06
	65,1	0,35	2,40	0,28	0,01	0,05

Im Falle des Mangans überschreiten die Gehalte manchmal die Grenze von 5000 p. p. m., was eine gleichzeitige Aufnahme dieses Elementes unmöglich macht. Falls die kleinen Gehalte dies zulassen, arbeitet man, um Mangan mit erfassen zu können, in einem aliquoten Teil des Extraktes, falls dies nicht möglich ist, muß das Mangan am besten kolorimetrisch bestimmt werden. In diesem Fall setzt man jedoch den Eichlösungen eine entsprechend hohe Menge Mangan in allen Testen zu.

Wenn es sich um die Bestimmung der Spurenelemente in Dünge- oder Futtermitteln handelt, wird ein hoher Eisengehalt der Proben die Auswertung mit Eisen als Standard vereiteln. In diesem Fall ist es angezeigt, das Eisen nach der Anreicherung durch Ausäthern zu entfernen und wie angegeben weiter zu verfahren. Es ist auch denkbar, Cadmium als Standard einzuführen, doch müssen hier Beeinflussungen der Cd-Linien durch hohe Gehalte an Mangan und Eisen befürchtet werden, was vor der Bestimmung durch Testaufnahmen zu untersuchen ist.

Die Richtigkeit der geschilderten Methode zur Bestimmung der Spurenelemente soll in der Folge an Hand der in der Literatur beschriebenen kolorimetrischen Methoden geprüft werden, da bis jetzt sowohl die Emissions- als auch die Absorptionsmethoden in dieser Richtung auf Übereinstimmung noch nicht untersucht wurden. Die genauen spektrographischen Verhältnisse der Rädchenmethode darzustellen, wird Gegenstand einer eigenen Veröffentlichung sein.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur Bestimmung der Spurenelemente in Böden, Pflanzen, Futter- und Düngemitteln beschrieben. Die Spurenelemente werden von den Hauptbestandteilen getrennt, durch Ausschüttelung mit komplexbildenden Verbindungen angereichert, nach Zerstörung der organischen Substanz die erhaltenen Konzentrate in Säure gelöst. Diese Lösungen werden auf einer Scheibe aus spektralreiner Kohle kontinuierlich aufgebracht und gleichzeitig im Funken spektrographiert. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich mit Lösungen bekannten Gehaltes in üblicher Weise.

Summary

A method is described for determining the trace elements in soils, plants, feeds, and fertilizers. The trace elements are separated from the major consti-

tuents and concentrated by shaking with complex-forming compounds, after destroying the organic material, the concentrate obtained is dissolved in acid. These solutions are brought continuously on a disk of spectrum carbon and simultaneously spectrographed in sparks. The evaluation is made by comparison with solutions of known content in the usual manner.

Résumé

Description d'une méthode de dosage des oligoéléments dans les sols, les plantes, la nourriture et les engrais. Les éléments sont séparés de la matière à analyser, concentrés par agitation avec des substances complexantes. Après destruction de la matière organique les concentrés obtenus sont dissouts dans un acide. Ces solutions sont amenées de façon continue sur un disque en carbone pur et analysées par spectrographie d'étincelles. La détermination se fait par comparaison avec des solutions étalons suivant la méthode classique.

Diskussion

H. *N. W. H. Addink* (Eindhoven): Prüfen Sie Ihre Methode in der Weise, daß eine bestimmte Menge der Probe ausgelaugt und dann wie beim Additionsverfahren eine bekannte Menge zugesetzt wird, die dann wiedergefunden wird? Wie haben Sie festgestellt, daß 24stündiges Auslaugen des Bodens mit Ammoniumacetat hinreichend ist und man nicht noch länger extrahieren müßte?

H. *H. Schüller:* Es geht mir nicht darum, die Spurenelemente quantitativ aus dem Boden herauszubekommen, sondern im wesentlichen geht es um Vergleichszahlen. Die Pflanze kann, wie erwähnt, nur einen Bruchteil der im Boden vorhandenen Spurenelemente lösen. Vielleicht ist zum Beispiel 10- oder 100mal mehr Kupfer in einem Boden enthalten, als man mit der Methode findet. Das Extraktionsverfahren ist mehr oder weniger willkürlich gewählt. Es wird 24 Stunden mit einem bestimmten Extraktionsmittel bei bestimmtem pH extrahiert. Es wäre natürlich durchaus möglich, daß nach 48 Stunden, nach einer Woche oder nach einem Monat noch mehr extrahiert wird.

H. *N. W. H. Addink: Mitchell* gibt aber bei der Beschreibung seiner Methode an, genau zu wissen, wieviel von den verschiedenen Spurenelementen im Boden enthalten ist.

H. *H. Schüller:* Nein, *Mitchell* macht es genau so wie ich. Er extrahiert mit 0,5-n Essigsäure bei pH 2,5. Das tue ich deswegen nicht, weil wir hier in Österreich Böden mit sehr viel Calciumcarbonat haben, das die Säure bei der Extraktion neutralisieren würde, so daß dann die Extraktion praktisch vielleicht bei pH 6 vor sich ginge und somit die Extrakte saurer und alkalischer Böden nicht miteinander vergleichbar wären.

H. *N. W. H. Addink: Mitchell* sagt, er weiß genau, wieviel in dem ganzen Material anwesend ist, das sollte man also doch vielleicht ein wenig bezweifeln. Ist das auch Ihre Auffassung?

H. *H. Schüller: Mitchell* macht sich über die Gesamtmenge keine Gedanken, er verfährt prinzipiell so wie ich, indem er eine bestimmte Menge 24 Stunden durch Schütteln mit Säure extrahiert. Das Problem ist ja vom landwirtschaftlichen Standpunkt gestellt.

Literatur

[1] *J. P. Pagliassotti* und *F. W. Porsche*, Analyt. Chemistry **23**, 198, 1820 (1951) **24**, 1403 (1952); *R. E. Mosher, E. J. Bird* und *A. J. Boyle*, Analyt. Chemistry **23**, 1514 (1951); *R. G. Smith, A. J. Boyle, W. G. Fredrick* und *Bennie Zak*, Analyt. Chemistry **24**, 406 (1952); *H. A. Heller* und *R. W. Lewis*, Analyt. Chemistry **25**, 1038 (1953).

Aus dem Institut für allgemeine und angewandte Geologie und Mineralogie der Universität München

Spektralanalytische Bestimmung kleiner Einschlüsse in Gesteinen mittels Hochfrequenzanregung*

Von

A. Maucher und **S. Auerhammer**

(Eingelangt am 29. August 1955)

Die Notwendigkeit, in Anschliffen von Gesteins- und Erzproben kleinste Einschlüsse — von etwa 0,1 mg und darunter und einem Durchmesser von weniger als 0,5 mm — zu identifizieren, veranlaßte uns, eine Methode auszuarbeiten, die erlaubt, solche Stellen möglichst rein, d. h. ohne das daneben und darunter liegende Material zu analysieren. Neben den bekannten Methoden der Mikroanalyse kommt dafür vor allem die Emissionsspektralanalyse in Frage. Man kann zu diesem Zweck die zu untersuchende Stelle herausbohren und in üblicher Weise in der Lochkohle zur Anregung bringen, wobei dann die Reinheit der Probe weitgehend davon abhängt, wie unvermischt man sie erhalten konnte. Besser läßt sie sich erfassen, wenn man die Stelle direkt auf dem Anschliff anregt.

Der Anschliff wird dazu zweckmäßig von unten her bis zu dieser Stelle — bis auf 3 bis 4 mm Abstand — angebohrt, mit einer Stromzuleitung versehen und je nach Bedarf mit der Anode oder Kathode des Gleichstromteils verbunden. Als Gegenelektrode verwenden wir einen Platindraht von 0,5 mm Dicke. Dabei treten die Platinlinien im Spektrum intensiv auf, so daß dann, wenn auch auf Platin geprüft werden soll, eine andere Gegenelektrode zu wählen ist.

Zur Anregung verwenden wir den Hochfrequenzfunken, wie dies in zahlreichen Arbeiten beschrieben wurde, von denen wir hier nur auf die grundlegenden von *Wa. Gerlach* und Mitarbeitern[1] sowie von *H. Triché*[2] verweisen. Daß bisher die Hochfrequenzanregung bei der *Lokalanalyse* verhältnismäßig wenig verwendet wird, liegt daran, daß entweder — bei hoher Leistung — der Krater zu tief und zu breit ausgebrannt wird[3] oder —

* Vorgetragen von *Franziska Pruckner*.

bei geringer Leistung — der Funken zu schwach wird und nicht an der gewünschten Stelle „stehen bleibt".

Wir haben daher ein Gerät entwickelt, das eine *Kombination* von Hochfrequenzgenerator und Gleichstromspannungserzeuger mit Stromstabilisierung darstellt*.

Durch eine sorgfältige Abbildung des schmalen, aber intensiven Funkens auf den Spektrographenspalt erreicht man eine hohe Lichtausbeute. Während der Aufnahme muß die genaue Abbildung des Funkens kontrolliert werden; dies ist bei Belichtungszeiten von 20 bis 90 sec, wie wir sie benötigen — je nach Material —, ohne weiteres möglich. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Gitterspektrographen mittlerer Dispersion — 5,5 Å/mm — von Jarrell-Ash auf Perutz B Blau Film. Unter diesen Bedingungen erhalten wir bei einer Spaltbreite von 30 μ das Eisenspektrum aus der Thera-Kohle bei 5 Amp. deutlich in 12 sec Belichtungszeit. Mit der gleichen optischen Anordnung bekommen wir die Linien des Hauptbestandteils der nach unserer Methode angefunkten Stelle, je nach der Art des Elements in 10 bis 30 sec Belichtungszeit. Dabei kann die Anfunkstelle kleiner als 1 mm Durchmesser gehalten werden, die Tiefe des Kraters ist kleiner als sein Durchmesser.

Die Anregungsbedingungen richten sich weitgehend nach dem Material, seiner Leitfähigkeit, Hitzebeständigkeit und danach, ob nur die Linien des Hauptbestandteils oder auch die eventuell vorhandenen Beimengungen benötigt werden. Um diese Anpassung an den Einzelfall zu erreichen, die man am besten erst in einem Vorversuch vor der eigentlichen Aufnahme ermittelt, ist der Hochfrequenzgenerator in fünf Stufen und mit einem Feinregler von 20 Watt bis zu 150 Watt einzustellen. Die erzeugte Hochspannung wird über ein Kabel zur Auskoppelspule geleitet, in der sie hochtransformiert und mit dem Gleichstrom gemischt wird. Dieser Hochfrequenzfunke zündet direkt, die Anheizzeit beträgt etwa 0,5 sec. Der Gleichstromspannungserzeuger liefert eine maximale Ausgangsspannung von 2000 V und ist durch einen Regler stufenlos von 10 bis 250 mA einstellbar. Durch eine geeignete Schaltung behält der einmal eingestellte Strom seinen Wert, auch wenn der Außenwiderstand des Funkens sich ändert. Dadurch wird eine hohe Konstanz des Funkens und eine gleichmäßige Anregung der Probe erreicht. Der Stufenschalter des Hochspannungserzeugers erlaubt wahlweise mit Gleichstrom — bis zu 30 A —, mit gemischten Gleichstrom-Funkenimpulsen und mit reinem Funken zu arbeiten. Als günstige Anregungsbedingungen ergaben sich bei vorläufigen Versuchen von *F. Pruckner* eine Hochfrequenzleistung von 30 bis 50 Watt und Gleichstromstärken von 10 bis 30 mA. Unter diesen Bedingungen

* Der Funkengenerator wird im Hochfrequenzlaboratorium S. Auerhammer in Gröbenzell bei München hergestellt.

ergaben sich bei der oben genannten optischen Anordnung in 30 bis 50 sec gut auswertbare Spektra.

Zu den Vorteilen der Methode gehört, daß keine Cyanbanden auftreten, die gerade beim Gitterspektrographen mit den sich überdeckenden Ordnungen stören. Die Anordnung kann auch zur Anregung von Pulvern verwendet werden, die dazu in Röhrchen aus Zirkon oder Aluminiumoxyd eingefüllt werden, die einen Metalldraht als Elektrode enthalten. Geissleranregung in evakuierten Glasröhren ist damit gleichfalls möglich. Versuche zur Flammenanalyse, also Anregung durch Hochfrequenzentladung in zerstäubten Flüssigkeiten, sind derzeit in Arbeit. Eine ausführliche Veröffentlichung soll demnächst in der „Zeitschrift für Erzbergbau und Metallhüttenwesen" erscheinen.

Zusammenfassung

Es wird über ein Anregungsgerät berichtet, das bei gleichzeitiger Verwendung von Hochfrequenz- und Gleichstrom bei großer Variationsbreite der Anregungsbedingungen die Spektralanalyse kleiner Einschlüsse in Gesteinen und Metallen (point-to-plane) bei kurzen Belichtungszeiten — bis zu 10 sec — erlaubt.

Summary

A report is given of an inciting device, which with simultaneous use of high frequency and direct current at great variation ranges of the activation conditions, permits the spectral analysis of small inclusions in rocks, and metals (point-to-plane) at short irradiation periods (up to 10 seconds).

Résumé

Description d'un dispositif d'excitation qui permet l'analyse spectrale de petites inclusions dans les roches et les métaux (pointe sur plan), avec de courts temps d'éclairement (jusqu'à 10 secondes), par l'emploi simultané de courants de haute fréquence et continu et dans un vaste domaine de variation des conditions d'excitation.

Diskussion

H. *H. Svejda* (Wien): Ist die Herstellung dieser Geräte vollständig neu oder kann man irgendwelche in einem spektrochemischen Laboratorium vorhandene Energiequellen leicht dazu umbauen?

Fr. *F. Pruckner:* Das wird wahrscheinlich nicht leicht möglich sein. Die technische Anfertigung ist nicht so ganz einfach. Das Wesentliche des technischen Anteiles — wir verdanken es Herrn *Auerhammer* — ist, daß man den Funken gleich absolut konstant halten kann. Es ist für eine automatische Gleichhaltung des Gleichstromes und für sehr große Variationsmöglichkeiten gesorgt. Bei weiteren Arbeiten wird sich zeigen, daß bei der Anregung anderer Elemente auch andere Spannungen sowohl im Gleichstromkreis wie auch im Hochfrequenzwechselstromkreis gebraucht werden. Wir haben sehr große Kombinationsmöglichkeiten vorgesehen.

H. *H. Svejda:* Wie groß ist der Durchmesser der abgefunkten Stellen?

Fr. *F. Pruckner:* Dieser war 1 mm. Ich hoffe aber, in kurzer Zeit schon mit 0,1 mm auszukommen. Dies ist aber dann eine Frage des Abdeckens. Jetzt haben wir mit Glimmer abgedeckt. Das geht aber dann bei den sehr hohen Temperaturen nicht: der Glimmer schmort weg.

H. *H. Svejda:* Eine weitere Schwierigkeit beim Abdecken ist, daß manchmal auch Teile des Glimmers mitangeregt werden. Darauf wurde schon verschiedentlich hingewiesen. — Haben Sie es mit Differenzspektren, also ohne Abdecken versucht?

Fr. *F. Pruckner:* Nein, aber das ist eine Anregung.

H. *H. Svejda:* Ich habe das schon versucht. Wir hatten z. B. seinerzeit das Problem, Schlackenschweißdrähte zu untersuchen. Da gelang es, auch den Inhalt von Spalten in der Größenordnung von wenigen Zehntelmillimetern zu identifizieren.

Fr. *F. Pruckner:* Ja, das müßte man ohne weiteres können. Sie können z. B. auch auf einem Erzschnitt sozusagen spazierenfahren, wenn der Geologe oder Mineraloge das Probestück vorher anzeichnet. Man macht dann nämlich ein örtliches Fahrspektrogramm.

H. *H. Svejda:* Es ist auch in „Spectrochimica Acta" eine Vorrichtung für ein „zweidimensionales Fahrspektrogramm" angegeben worden. — Sie haben mit Kondensor auf dem Spalt abgebildet? Und nicht direkt vor dem Spalt?

Fr. *F. Pruckner:* Ja, 1 : 1. Knapp vor dem Spalt geht es etwas schlechter, weil die Stifte ja eine gewisse Ausdehnung haben. Wenn wir aus der Düse anregen, dann können wir direkt vor den Spalt gehen, aber ich glaube nicht, daß das ein großer Vorteil wäre.

H. *H. Svejda:* Nein, und die Lichtausbeute ist auch keineswegs besser.

H. *K. Peters* (Wien): Vor etlichen Jahren haben *Paneth* und ich einmal versucht, den Spalt wegzulassen. Das müßte im Prinzip ja auch mit einem Funken gehen.

Fr. *F. Pruckner:* Natürlich, das geht, wenn der Funken sehr klein ist.

H. *K. Peters:* Dann bekommt man eine sehr große Lichtausbeute.

Fr. *F. Pruckner:* Es ist versucht worden, auf einem Zylinder abzubilden und das Zylinderbild an Stelle des Spaltes zu nehmen. Ich habe das noch nicht versucht.

H. *K. Peters:* Wir haben damals Helium und Neon in einer Kapillare von 0,1 mm Durchmesser über Quecksilber bei sehr mäßigem Druck eingeschlossen und außen herum ein Glas gelegt und mit einem ganz beliebigen Funkeninduktor angeregt. Dann haben wir auf die Kapillare eine Zylinderlinse mit Kanadabalsam aufgeklebt, so daß das Bild der Kapillare sehr eng wurde. Dann erhält man einen ganz haarfeinen Strich schon ohne Spalt. Man muß dann nur eine Standardlinie verwenden — beim Helium und Neon war das sehr einfach, weil die zwei gelben He-Linien so charakteristisch neben der Na-Linie liegen. Wir konnten, glaube ich, mit 10^{-12} Normal-cm³ Helium auf diese Weise Helium und Neon untersuchen. Nun denke ich, daß sich im Prinzip auch ein ganz kleiner Funken zu einer solchen Methode eignen sollte.

Fr. *F. Pruckner:* Wir werden das mit unseren Lösungen versuchen.

H. *H. Straubel* (Jena): Hat man einmal versucht, diese ganze Spektralanalyse unter Hochdruck zu machen? Sie brauchen ja Ihre ganze Funkenerzeugung bloß gewissermaßen in ein Glas bei genügend hohem Druck ein-

zuschließen. Dann hat der Funken einen genügend kleinen Querschnitt, etwa wie bei einer Quecksilberhöchstdrucklampe. Sie brauchen dazu allerdings 60 bis 100 Atmosphären. Z. B. können Sie mit Helium füllen, aber Sie haben dann einen außerordentlich schmalen Funkenkanal mit nur 0,2 bis 0,3 mm Durchmesser bei sehr großen Stromstärken. Damit hätten Sie den kleinen Spalt.

Fr. *F. Pruckner:* Glauben Sie, daß solche Röhren diese hohen Temperaturen aushalten?

H. *H. Straubel:* Ja, Quarz hält das ohneweiteres aus.

H. *K. Peters:* Ich glaube, das ist ein guter Vorschlag; denn Quarz würde bei einer Wandstärke von 5 mm ohne weiteres 100 Atmosphären aushalten, und, wenn man mit flüssiger Luft einfriert und abschließt, dann müßte es gut gehen.

H. *H. Straubel:* Außerdem ist die Frage der Temperatur. glaube ich, ganz unwesentlich, da Sie ja nur 5 oder 6 Sekunden belichten.

Fr. *F. Pruckner:* Das kommt darauf an: Eisen z. B. nur 5 oder 6 Sekunden, andere Elemente natürlich etwas länger.

H. *H. Straubel:* Ja, aber das spielt keine Rolle.

H. *H. Svejda:* Glauben Sie nicht, daß bei zu hohem Druck die Linienqualität durch Druckverbreiterung leidet?

H. *H. Straubel:* Da haben Sie recht, man müßte das untersuchen.

H. *H. Svejda:* Haben Sie, Fr. *Pruckner*, schon die Anordnung von *Koehler* (Hanau) [Spectrochim. Acta **6**, 223 [1954]] versucht? Sie ist nur apparativ umfangreicher, weil man mit einem binokularen Mikroskop arbeitet. Aber vielleicht wäre auch das eine Möglichkeit.

Fr. *F. Pruckner:* Nein, so haben wir es noch nicht gemacht. Wir haben einen Spiegel verwendet und damit gleichzeitig Anfunkstelle und Funkenbild beobachten können.

H. *H. Svejda:* Daher meine Bemerkung, die Anordnung des *Koehler*schen Stativs sei etwas anspruchsvoller.

Literatur

[1] *Wa. Gerlach* und *E. Schweitzer*, Z, anorg. Chem. **195**, 255 (1931); Die chemische Spektralanalyse, 1. Teil. Grundlagen und Methoden. Leipzig: Voss 1930; *Wa. Gerlach* und *W. Rollwagen*, Metallwirtschaft **16**, 1083 (1937).

[2] *H. Triché*, Bull. soc. chim. France **1949**, 372; **1937**, 1714; C. r. acad. sci., Paris **201**, 1178 (1935); 202, 745 (1936).

[3] vgl. *J. K. Hurwitz*, Spectrochim. Acta **6**, 247 (1954).

Spektrophotometrische Messung an kleinsten Flüssigkeitsmengen

Von

G. Hansen, Oberkochen

Mit 1 Abbildung

(Eingelangt am 12. April 1955)

Voraussetzungen und Fragestellung

Zur Ausführung einer spektrophotometrischen Absorptionsmessung gehören: Ein Sender, bestehend aus Strahlungsquelle mit Filtereinrichtung, ein Strahlungsempfänger mit Anzeigegerät und zwischen beiden ein Behälter zur Aufnahme der zu messenden Flüssigkeit. Je geringer die Extinktion der Flüssigkeit ist, desto größer wird die Schichtlänge genommen werden müssen, damit eine angemessene Genauigkeit bei der Bestimmung der Extinktion der Lösung und der Konzentration der absorbierenden Substanz erreicht werden kann. Wenn also die Substanzmenge vorgeschrieben ist, an der gemessen werden soll, wird die Frage nach der größten Schichtlänge zu stellen sein, an der eine Messung ausgeführt werden kann. Wir wollen untersuchen, ob es bei einer gegebenen Anordnung möglich ist, durch geschickte Maßnahmen das Volumen immer weiter zu verkleinern bzw. die Schichtlänge immer weiter zu vergrößern oder ob durch gesetzmäßige Beziehungen zwischen den Abmessungen der Anordnung dem Volumen eine Grenze gezogen ist, die auf keine Art unterschritten werden kann. Wir wollen im folgenden immer annehmen, daß ein kreiszylindrisches Rohr verwendet wird. Durch Benutzung anderer Gefäßformen läßt sich das Volumen verkleinern. Bei Verwendung äußerst kleiner Substanzmengen ist aus praktischen Gründen nur die Verwendung kreiszylindrischer Rohre diskutabel.

Betrachten wir eine Figur, die vor längerer Zeit in einer amerikanischen Zeitschrift[1] veröffentlicht wurde, um eine Methode darzustellen, nach der man kleine Präzisionsküvetten verwenden könne. Die Küvette steht zwischen zwei kleinen Linsen 3 und 4, die Lichtquelle wird von 1 durch einen großen Kondensor an den Ort 2 in etwa gleicher Größe abgebildet.

Dies geschieht offenbar nur, um mit dem Bild der Lichtquelle genügend nahe an die kurzbrennweitige Linse 3 heranzukommen. Das wäre mit der Lampe selbst nicht möglich, weil der Glaskolben der Glühlampe einen zu großen Durchmesser hat. Die Linse 4 erzeugt wiederum ein Bild der

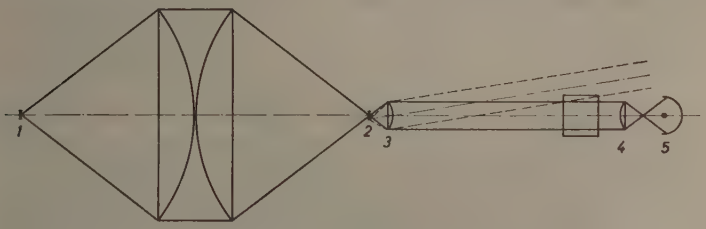


Abb. 1. Beleuchtung von Küvetten mit kleinem Volumen

Lichtquelle dicht vor der Photozelle 5. Diese Darstellung könnte einen leicht auf den Gedanken bringen, daß man den Durchmesser der Linsen 3 und 4 beliebig verkleinern und den Abstand zwischen beiden Linsen auch beliebig vergrößern kann, daß man also bezüglich der Verkleinerung des Durchmessers der Küvette und der Vergrößerung ihrer Länge keinerlei Beschränkungen unterworfen ist. Daß die Dinge nicht so einfach liegen, erkennt man, wenn man Grenzstrahlenbüschel zeichnet, die nicht — wie die ausgezogenen Strahlen — nur zur Mitte der Lichtquelle gehören, sondern zu ihrem Rand. Die gestrichelten Strahlen gehen von dem unteren Rand der Lichtquelle bei 2 aus. Man sieht, daß diese Lichtstrahlen die Linse 4 überhaupt nicht erreichen, also auch nicht zur Beleuchtung der Photozelle beitragen können. Wir werden sehen, daß zwischen den Abmessungen der Küvette und dem Lichtstrom, der den Strahlungsempfänger trifft, Beziehungen bestehen, die bei dem Entwurf von Spektralphotometern berücksichtigt werden müssen.

Filterphotometer

Betrachten wir zunächst einen sehr einfachen Fall — den eines Filterphotometers, bei dem also die Auswahl eines beschränkten Spektralbereiches aus der Strahlung der Lichtquelle durch ein Absorptionsfilter erfolgt. Dieser Fall ist deshalb einfach, weil das Absorptionsfilter, das man leicht in beliebiger Größe herstellen kann, in geometrischer Hinsicht keinerlei Beschränkungen für die übrigen Teile der Anordnung bedingt. Bei gegebener Empfindlichkeit des Empfängers und des Anzeigegerätes ist ein bestimmter Mindest-Lichtstrom vorgeschrieben, der Vollausschlag am Anzeigegerät gibt, also die Ausnutzung der vollen Meßgenauigkeit ermöglicht. Dieser Lichtstrom ist proportional mit der Leuchtdichte B

der Lichtquelle, außerdem hängt er von den geometrischen Verhältnissen der Anordnung ab:

$$\Phi = B \cdot \Lambda .$$

Hierbei soll die Größe Λ — der Lichtleitwert — die geometrischen Verhältnisse beschreiben. Zwischen Λ und den Abmessungen des Substanzrohres besteht eine Beziehung, die wir durch das Volumen V, die Schichtlänge s und das Brechungsvermögen n der Substanz ausdrücken:

$$\Lambda = \frac{n^2 V^2}{s^4} = \frac{\Phi}{B}.$$

Bei dieser Anordnung begrenzt die Küvette selbst den Lichtstrom. Wenn der Mindest-Lichtstrom, der zur Messung gebraucht wird, ebenso vorgeschrieben ist wie die Leuchtdichte der Lichtquelle, so ist damit zwischen dem Volumen und der Schichtlänge eine feste Beziehung gegeben. Nehmen wir an, daß wir als Lichtquelle eine Glühlampe mit einer Leuchtdichte von 10^3 Stilb verwenden, als Filter ein Grünfilter der Art des S 55 mit einer Halbwertsbreite von 220 Å und einem Gesamtdurchlaßgrad von $\frac{1}{2000}$. Dann ist für die Leuchtdichte B zu setzen

$$\frac{10^3}{2000} = \frac{1}{2}.$$

Wenn als Empfänger ein Photoelement mit einer Empfindlichkeit von 300 μA/Lumen und als Anzeigeinstrument ein Zeigerinstrument verwendet werden soll, das bei einem Strom von 20 μA den Vollausschlag anzeigt, brauchen wir einen Lichtstrom von

$$\frac{20}{300} = \frac{1}{15}\ \text{lm}.$$

Wir erhalten zwischen dem Volumen und der Schichtlänge die Beziehung:

$$V = \frac{s^2}{n}\sqrt{\Lambda} = \frac{s^2}{n}\sqrt{\frac{\Phi}{B}} = \frac{s^2}{1{,}33}\sqrt{\frac{2}{15}} = s^2 \cdot \frac{1}{1{,}33 \cdot 2{,}74} = s^2 \cdot 0{,}27,$$

das heißt also, wenn wir eine Schichtlänge von 10 cm verwenden wollen, brauchen wir zur Füllung der Küvette 27 ml.

Betrachten wir als zweites Beispiel die Verwendung einer Quecksilberlampe, bei der sich die grüne Linie mit einer guten Ausbeute herausfiltern läßt. Wir können hier für die Strahlungsdichte annehmen:

$$B^* = 0{,}2\left[\frac{W^*}{\text{cm}^2 \cdot \omega}\right]$$

B^* bedeutet die Strahlungsleistung, angegeben in Watt für die Einheit der strahlenden Fläche und des Raumwinkels. Dementsprechend müssen wir auch für die Zellenempfindlichkeit die spektrale Empfindlichkeit in Amp/W Strahlungsleistung verwenden. Bei einem Selen-Photoelement ist sie im Grünen etwa 0,1. Wenn wir für das Filter einen Durchlaßgrad von $^1/_3$ annehmen, erhalten wir zwischen Volumen und Schichtlänge die Beziehung:

$$V = s^2 \cdot 0{,}045.$$

Hier reicht also zur Füllung einer Küvette von 10 cm Länge schon ein Volumen von 4,5 ml aus. Eine weitere Verringerung des Volumens wäre nur möglich durch Verwendung empfindlicherer Empfänger oder bei Benutzung einer Glühlampe durch Verwendung wirksamerer Mittel zur spektralen Zerlegung der Strahlung.

Wenn als Lichtquelle eine Glühlampe oder Quecksilberlampe mit Farbfilter angenommen wird, als Empfänger ein Selenphotoelement mit einem Meßinstrument bestimmter Stromempfindlichkeit, so erhalten wir einen Zusammenhang zwischen Schichtlänge und Volumen der Küvette, der jeder Schichtlänge das zur Füllung der Küvette notwendige Volumen zuordnet. Bei Verwendung eines kleineren Volumens würde die Empfindlichkeit der Anordnung nicht voll ausgenutzt, dagegen würde die Benutzung einer größeren Küvette keinen Gewinn bringen; denn schon mit der durch die Formel angegebenen Küvettengröße wird der volle Ausschlag des Meßinstrumentes erreicht.

Monochromator

Wenn an die Stelle des Absorptionsfilters ein optisches Instrument — ein Monochromator — tritt, so ist nicht mehr die Küvette mit ihren geometrischen Abmessungen für die Größe des Lichtstromes allein bestimmend, auch der Monochromator hat einen bestimmten Lichtleitwert. Küvette und Monochromator müssen nach einfachen Regeln durch abbildende Linsen miteinander verbunden werden. Von dem Lichtleitwert des Monochromators, der im allgemeinen mit rechteckigen Spalten verwendet wird, können wir bei kreiszylindrischen Küvetten nur den Teil ausnutzen, der quadratisch geformten Spalten entspricht. Die verschiedenen Teile einer komplizierten optischen Anordnung müssen stets den gleichen Lichtleitwert haben, da der Bestandteil mit dem kleinsten Lichtleitwert bestimmend für die Wirksamkeit der gesamten Anordnung ist. Wir nehmen an, daß am Prisma oder am Gitter des Monochromators das Lichtbüschel einen quadratischen Querschnitt hat, ferner, daß für diejenige Wellenlänge, für die wir die Abmessungen der Anordnung bestimmen wollen, der Spalt des Monochromators ebenfalls quadratische Form hat. Wir nutzen bei einer solchen Anordnung

den Lichtleitwert des Substanzrohres nicht voll aus, sondern nur das Volumen, das ein dem Zylinder eingeschriebenes Rohr von quadratischem Querschnitt haben würde. Das Volumen V', das wir zur Füllung des zylindrischen Rohres benötigen, ist also größer als das optisch ausgenutzte Volumen V:

$$\frac{2}{\pi} \cdot \frac{nV'}{s^2} = \sqrt{\Lambda_\square}\,.$$

Das Symbol $\Lambda_\square$ soll bedeuten, daß der Monochromator mit quadratischem Spalt verwendet wird. Welches ist nun der Lichtleitwert des Monochromators? Man kann die Eigenschaften des Monochromators auf verschiedene Weise beschreiben. Am einfachsten ist es, wenn man diejenige Größe verwendet, die auch in anderer Beziehung für seine Leistung bestimmend ist, nämlich das Auflösungsvermögen (AV). Diesem Auflösungsvermögen ist der Lichtleitwert stets proportional, ferner ist der Lichtleitwert der Größe des jeweils benutzten Spektralbereiches $\Delta\lambda$, der von der eingestellten Spaltbreite abhängig ist, proportional. Die Spaltlänge l selbst tritt dabei in der Form der sogenannten reduzierten Spaltlänge auf. Die reduzierte Spaltlänge ist das Verhältnis der tatsächlichen Spaltlänge zu der Öffnungszahl k des Monochromators. Diese Öffnungszahl wiederum ist das Verhältnis der Brennweite des Austrittsrohres zu der Breite des Büschels am Prisma:

$$\Lambda = AV \cdot \Delta\lambda \cdot \frac{l}{k}\,.$$

Wenn wir einen quadratischen Spalt verwenden, also die Länge des Spaltes gleich seiner Breite machen, tritt naturgemäß die Spaltlänge nicht mehr auf. Dann ist der Lichtleitwert:

$$\Lambda_\square = (\Delta\lambda' \cdot AV)^2.$$

Hier ist also $\Delta\lambda'$ die Breite desjenigen Spektralbereiches, der nunmehr den quadratischen Spalt verläßt.

Zur Bestimmung des Lichtstromes, der aus dem Monochromatorspalt austritt, müssen wir jetzt anstelle der vorher verwendeten Strahlungsdichte B^* das Produkt aus der spektralen Strahlungsdichte B_λ^* und der Breite des Spektralbereiches $\Delta\lambda$ verwenden. Demnach ist also jetzt die Strahlungsleistung:

$$\Phi = B_\lambda^* \cdot \Delta\lambda \cdot \Lambda\,.$$

Die Empfindlichkeit eines gegebenen Spektralphotometers wird beschrieben durch die Größe des Spektralbereiches $\Delta\lambda$, der gerade zur Erzielung des Vollausschlages am Meßinstrument ausreichend ist. Diese Angabe bezieht sich auf die Verwendung der vollen am Monochromator

vorhandenen Spaltlänge l. Wir fragen jetzt nach der Größe des Spektralbereiches $\Delta\lambda'$, der bei Benutzung eines quadratischen Spaltes die gleiche Strahlungsleistung liefert. Zur Berechnung dieses $\Delta\lambda$ haben wir also gleichzusetzen:

$$\Phi^* = B_\lambda^* \cdot \Delta\lambda^2 \cdot AV \cdot \frac{l}{k} = B_\lambda^* \cdot \Delta\lambda'^3 \cdot AV^2,$$

so daß wir zur Berechnung von $\Delta\lambda'$ erhalten:

$$\Delta\lambda'^3 = \Delta\lambda^2 \cdot \frac{l}{k} \cdot \frac{1}{AV}.$$

Wenn wir daraus die Spaltbreite berechnen wollen, können wir die Beziehung zwischen der Spaltbreite σ, der Größe des Spektralbereiches $\Delta\lambda'$ und den schon bekannten Größen: Öffnungszahl und Auflösungsvermögen benutzen:

$$\sigma = \Delta\lambda' \cdot k \cdot AV.$$

Wir können auch diese Spaltbreite unmittelbar ausdrücken durch den Spektralbereich $\Delta\lambda$, der für die Spaltlänge l Vollausschlag liefern würde:

$$\sigma = \sqrt[3]{(\Delta\lambda \cdot AV)^2 \cdot k^2 \cdot l}.$$

Wenn wir für ein größeres Spektralintervall σ zu bestimmen haben, so müssen wir das für diejenige Wellenlänge tun, bei der wir innerhalb des gesamten Bereiches die größte Spaltbreite benötigen. Das muß also die Wellenlänge sein, bei der das Produkt aus $\Delta\lambda$ und dem Auflösungsvermögen seinen größten Wert hat. Bei jeder anderen Wellenlänge ist die Höhe des Spaltes σ die gleiche. Die Breite dagegen, die wir brauchen, um Vollausschlag zu erzielen, ist stets kleiner als σ. Wenn wir bei einer solchen Wellenlänge die Größe des Spektralbereiches $\Delta\lambda'$ errechnen wollen, so haben wir dafür:

$$\frac{\Delta\lambda'}{\Delta\lambda} = \sqrt{\frac{l}{\sigma}}.$$

Es ist also das Verhältnis des $\Delta\lambda'$ zu dem $\Delta\lambda$, das für volle Spaltlänge l gilt, in dem ganzen Bereich das gleiche.

Beispiel

Sehen wir uns nun an einem Beispiel an, wie die Verhältnisse bei einem handelsüblichen Spektralphotometer liegen. Wir betrachten das neue Zeiss-Spektralphotometer P M Q II. Wir wollen mit der Glühlampe in dem ganzen Bereich zwischen 3500 und 10000 Å mit Quarzprisma messen. Der größte Wert von $\Delta\lambda \cdot AV$ ist bei 3500 Å vorhanden. Hier brauchen wir 4,0 Å, um Vollausschlag zu erzielen. Daraus errechnet sich ein $\Delta\lambda'$

von 31 Å und für diese Wellenlänge ein quadratischer Spalt mit der Kantenlänge von 0,24 mm. In der folgenden Tabelle sind die Werte von $\Delta\lambda$ und $\Delta\lambda$ für den ganzen Bereich zusammengestellt:

λ	$\Delta\lambda$	λ'
3500	4,0	31
4000	2,5	19
4500	2,2	17
5000	2,1	16
5500	2,3	18
6000	2,6	20
7000	18	140
8000	17	130
9000	20	150
10000	22	170

Zwischen dem Volumen V' und der Schichtlänge besteht hier folgende Beziehung:

$$V' = s^2 \cdot 0{,}0023.$$

Bei 10 cm Schichtlänge ist also nur ein Volumen von 0,23 ml notwendig.

Noch günstiger liegen die Verhältnisse, wenn wir nur bei einer einzigen Wellenlänge innerhalb dieses Spektralbereiches messen wollen. Wenn die Messung beispielsweise bei 5500 Å vorgenommen werden soll, wo bei voller Spaltlänge von 1,4 cm ein Bereich von 2,3 Å zurMessung ausreichend wäre, erhalten wir einen quadratischen Spalt von 0,07 mm Kantenlänge, was einem Spektralbereich von 33 Å entspricht. Zwischen Volumen und Schichtlänge besteht jetzt die Beziehung:

$$V' = s^2 \cdot 0{,}0007.$$

Hier ist also bei 10 cm Schichtlänge ein Volumen von weniger als 0,1 ml notwendig.

Ausführung der Anordnung

Diese Betrachtungen sollen zeigen, welches das kleinste Volumen ist, mit dem man bei gegebener Schichtlänge an dem als Beispiel gewählten Spektralphotometer messen kann und wie man aus den bekannten Eigenschaften des Instrumentes die Beziehung zwischen Volumen und Schichtlänge berechnet. Es ist noch etwas über die Art der Anordnung zu sagen. Im Prinzip ist die optische Einrichtung sehr einfach. Der Lichtstrom, der vom Monochromator geliefert wird, muß durch die Küvette hindurchgeleitet werden. Dazu ist nur notwendig, daß man die beiden den Lichtstrom im Monochromator begrenzenden Öffnungen auf die beiden Rohrenden abbildet, also den Spalt auf das eine Rohrende und die Prismenöffnung auf das andere. Hierzu sind grundsätzlich zwei Linsen ausreichend, von denen die eine dicht am Spalt, die andere an dem dem Spalt zugewandten Ende des Absorptionsrohres angebracht ist. Damit man mit Rohren von so geringem Querschnitt, wie sie hier aus energetischen Gründen verwendet werden können, überhaupt umgehen kann, müßten natürlich geeignete Hilfsmittel vorgesehen sein, um das Rohr zum Monochromator auszurichten und dafür zu sorgen, daß die

Bilder der Blenden des Monochromators symmetrisch zu den Rohröffnungen liegen. Besondere Schwierigkeiten wird unter Umständen das Füllen des Rohres und das luftdichte Verschließen bereiten, insbesondere dann, wenn nur ein Flüssigkeitsvolumen zur Verfügung steht, das um wenig größer ist als es zum Füllen der Küvette gebraucht wird. Das Ziel der Darstellung war aber vornehmlich zu ermitteln, welches die Grenzen der Leistungsfähigkeit eines solchen Mikro-Spektralphotometers sind.

Zusammenfassung

Bei jeder spektrophotometrischen Meßeinrichtung ist das Volumen aller Küvetten, die den gleichen Lichtstrom hindurchtreten lassen, proportional dem Quadrat der Küvettenlänge. Der Proportionalitätsfaktor hängt bei Filterphotometern nur von den Eigenschaften von Lichtquelle und Empfänger ab, bei Verwendung eines Monochromators außerdem von den Abmessungen des Monochromators, im wesentlichen von seinem Auflösungsvermögen. Bei handelsüblichen Spektralphotometern ist es im Grünen möglich, bei 10 cm Schichtlänge mit einem Volumen von weniger als 0,1 ml ohne Einschränkung der Meßgenauigkeit auszukommen.

Summary

In every spectrophotometric measuring device the volume of all cells, which permit the passage of the same light flux, is proportional to the square of the length of the cell. In the case of filter photometers, the proportionality factor depends solely on the characteristics of the light source and receiver; if a monochromator is used also on the dimensions of the monochromator, and essentially on its resolving powers. With the spectrophotometers on the market, it is possible in the green, when using a 10 cm path length, to get along with a volume of less than 0.1 ml without decreasing the precision of measurement.

Résumé

Dans toutes les installations de spectrophotométrie le volume de toutes les cuves qui laissent passer la même quantité de lumière est proportionnel au carré de leur longueur. Le facteur de proportionnalité dépend dans les photomètres à filtre, des propriétés de la source de lumière et du récepteur. En outre lorsqu'on utilise un monochromateur il dépend des caractéristiques de ce dernier, c'est-à-dire essentiellement de son pouvoir séparateur. Dans les spectrophotomètres du commerce on peut opérer avec une couche de 10 cm de long et un volume inférieur à 0,1 ml sans diminuer la précision de la mesure.

Literatur

[1] *R. B. Withrow, C. L. Shrewsbury* und *H. R. Kraybill*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. 8, 214 (1936).

Aus dem Laboratorium der Allgemeinen Elektricitätsgesellschaft AEG, Belecke / Möhne

Mikromethoden in der Halbleiterforschung

Von

Franz A. Pohl

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 16. März 1955)

Wenn man Angaben über die Leitfähigkeit von Halbleitersubstanzen in der Literatur vergleicht, so findet man bei gewissen Stoffen ganz erhebliche Differenzen zwischen Meßwerten verschiedener Autoren. Die Unterschiede betragen zuweilen ein oder mehrere Zehnerpotenzen, wie zum Beispiel beim technisch so bedeutenden Selen.

Die Ursachen dieser Diskrepanzen liegen zum größten Teil in der unterschiedlichen Reinheit der untersuchten Substanzen, das heißt, im Vorhandensein von Verunreinigungen, die bereits in sehr geringen Mengen elektrisch wirksam sind, indem sie das Valenzelektronensystem der kristallisierten Substanz stören. Dabei kann der Einfluß verschiedener Verunreinigungen verschieden sein, zum Beispiel in einem Falle die Leitfähigkeit erhöhen, im anderen herabsetzen.

Ein ideales Beispiel zur Veranschaulichung dieser elektronischen Effekte ist das Germanium.

Germanium kristallisiert im Diamantgitter. Jedes Germaniumatom ist im Kristallgitter tetraedrisch von vier anderen Germaniumatomen umgeben, wobei die Valenzelektronen zu Elektronenpaarbindungen zusammentreten. In dieser idealen Form ist Germanium Nichtleiter. Bereits bei geringer Energiezufuhr kommt jedoch eine Stromleitung dadurch zustande, daß von einem Bindungselektronenpaar ein Elektron abdissoziiert. Dieses Elektron kann sich im Gitter frei bewegen, bis es von einer in gleicher Weise entstandenen positiven Elektronendefektstelle eingefangen wird.

Nehmen wir an, daß bei unserem Beispiel dieser Strom der Elektronen von links nach rechts erfolgt, so wandern die durch Abdissoziation eines

Elektrons entstandenen positiven Defektstellen im entgegengesetzten Sinne von rechts nach links.

Im Gegensatz zur metallischen Leitfähigkeit nimmt die oben beschriebene Eigenleitung von Halbleitern mit zunehmender Temperatur stark zu, da die Dissoziationsvorgänge immer häufiger auftreten und immer mehr freie bewegliche Elektronen bzw. eine zunehmende Zahl von Defektstellen vorhanden sind. Diese Art der Leitfähigkeit würde bei einem Germanium auftreten, das keinerlei Fremdatome enthält.

Praktisch sind jedoch auch im reinsten Germanium noch etwa $10^{-7}\%$ Verunreinigungen enthalten. Daher tritt neben dieser Eigenleitung eine sogenannte Störleitung durch die von Verunreinigungen gebildeten Fremdstörstellen auf, die bei Normaltemperatur die Eigenleitung mehr oder weniger stark überlagert.

Wird zum Beispiel im Kristallgitter ein Ge-Atom durch ein Atom der 5b-Gruppe, etwa As ersetzt, so ordnen sich von den 5 Valenzelektronen des As-Atoms vier in die Valenzbindung des Germaniumgitters ein. Das fünfte Valenzelektron ist nur locker gebunden und wird leicht durch thermische Anregung in das Leitungsband abgespalten. Durch solche Fremdstörstellen wird Germanium zum Überschuß- bzw. n-Leiter. Wird ein Germaniumatom durch ein Element der 3b-Gruppe, etwa Gallium ersetzt, so ist an dieser Stelle im Gitter ein Elektron weniger vorhanden, als bei Aufrechterhaltung des normalen Valenzelektronensystems des Germaniums benötigt würde. Die Lücke kann durch ein Elektron aus dem Valenzband des Germaniums aufgefüllt werden, wobei eine Elektronendefektstelle und eine 3b-Atomstörstelle mit einfach negativer Ladung entstehen. Das Germanium wird zum Defektleiter.

Da die Zahl dieser freien Elektronen bzw. Defektstellen bei Zimmertemperatur praktisch nur von der Konzentration der eingebauten Fremdatome abhängig ist, sind Leitfähigkeitsangaben von Halbleitern nur sinnvoll, wenn genaue Reinheitsangaben gemacht werden können. Hierzu sind jedoch Mikromethoden und spurenanalytische Methoden erforderlich, die bis heute nur in sehr geringer Zahl in der Literatur enthalten sind.

Bei metallischen Spuren bereitet die Anreicherung und photometrische, polarographische oder spektrographische Bestimmung keine allzu großen Schwierigkeiten. Größere Schwierigkeiten bietet die Bestimmung von Nichtmetallspuren.

Infolge des Fehlens geeigneter Bestimmungsmethoden und der damit verbundenen mangelnden Kenntnis der Reinheit ist trotz zahlreicher Untersuchungen das Leitfähigkeitsverhalten des Selens in seinen Einzelheiten noch keineswegs geklärt. Man kann sich daher beim Selen noch keine so anschaulichen Vorstellungen über die Stromleitung machen, wie beim Germanium oder Silicium.

Unter anderem ist bekannt, daß Halogene die Leitfähigkeit des Selens

vergrößern, während gewisse Metalle die Leitfähigkeit möglicherweise durch Binden von Halogenstörstellen herabsetzen. Man muß beim Selen jedenfalls vermuten, daß die bisher gemessenen Leitfähigkeitswerte dem Zusammenwirken mehrerer Störstellenarten zuzuschreiben sind.

Um derartige Effekte näher zu untersuchen, sind wir bemüht, Mikromethoden auszuarbeiten, die es gestatten, Verunreinigungen in Halbleitern in den interessierenden Konzentrationen quantitativ zu bestimmen.

Im folgenden sei eine Methode zur Bestimmung von sehr geringen Mengen Chlorid und Bromid nebeneinander im Selen kurz geschildert.

Die Halogenbestimmung im Selen

Die elektrisch wirksamen Konzentrationen der genannten Halogene im Selen liegen zwischen 10^{-2} und 10^{-4}%. Es sind demnach bei Einwaagen von 100 bis 500 mg Selen Mikrogramm-Mengen an Halogen zu bestimmen.

Das Prinzip der Mikromethode umfaßt folgende Teiloperationen:

1. Lösen der Selenprobe in Salpetersäure in Gegenwart eines großen Überschusses von Silbernitrat.
2. Reduzieren der von der Lösung getrennten Silberhalogenide mit Hydrazin in natronalkalischer Lösung.
3. Potentiometrische Mikrotitration des in Salpetersäure gelösten Silbers in einem maximalen Volumen von 0,5 ml mit 0,02-n Rhodanidlösung.
4. Photometrische Brombestimmung als Eosin im Filtrat nach der Silberreduktion.

Die zur Bestimmung angewendeten chemischen Reaktionen sind seit langem in der Analyse bekannt. Dennoch waren zur Erzielung exakter und reproduzierbarer Analysenergebnisse bei den vorliegenden geringen Mengen zahlreiche Bedingungen zu untersuchen, auf die in der Literatur keine Hinweise zu finden waren.

Im einzelnen ist zu den Operationen zu bemerken: Das Lösen der Probe erfolgt in Spitzröhrchen auf dem Mikrowasserbad mit 2 bis 4 ml konz. halogenfreier Salpetersäure. Verluste durch Spritzen sowie das Verdampfen der Säure verhindert man durch Aufsetzen von Kühlerkugeln. Die Salpetersäure destilliert man in einer Quarzapparatur über Silbernitrat. Da es sich zeigte, daß Lichteinwirkung beim Lösevorgang durch Silberreduktion Pluswerte von 10 bis 50% bewirkt, führen wir diese Operation in einem schwarzen Kasten aus Kunststoff (Trovidur) durch.

Die Trennung der Silberhalogenide von der Lösung erfolgt durch Zentrifugieren und Absaugen mit Saugglocke und Kapillare. Filterstäbchen sind hierzu nicht zweckmäßig, da der am Filterstäbchen haftende Niederschlag schlecht weiterbehandelt werden kann.

Die potentiometrische Mikrotitration wird in einem maximalen Volumen von 0,5 ml vorgenommen, wobei ein 1 mm starker Silberdraht als Indikatorelektrode dient. Als Bezugselektrode verwenden wir eine Kalomelelektrode mit gesättigter Kaliumnitratlösung, die über eine Kapillare mit der Probelösung im Spitzröhrchen in Verbindung steht. Die Mikrobürette nach *Gorbach* taucht in die Lösung ein, die magnetisch gerührt

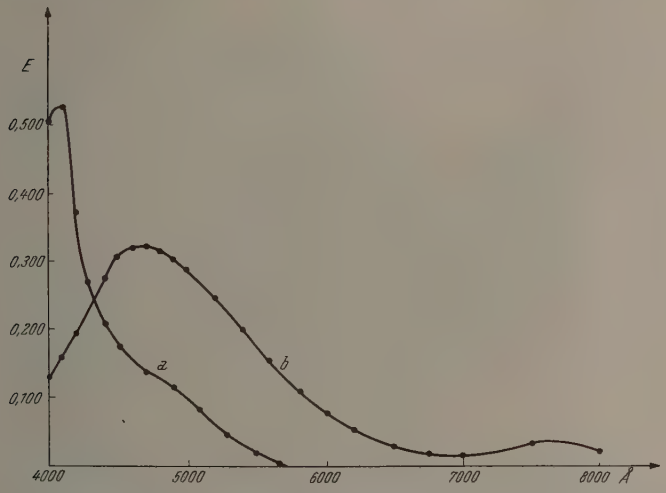


Abb. 1. Absorptionskurven von *a)* p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin, 0,002%, *b)* Silberkomplex des Reagens; d = 40 mm, Spektralphotometer Unicam Sp 500

wird. Die Titration erfolgt mit 0,02-n oder 0,01-n Rhodanidlösung in Schritten von 5 μl. Auf diese Weise gelingt es, Silbermengen bis zu 15 μg herab zu titrieren. Als Anzeigegerät stand uns ein „Pehavi" von Hartmann und Braun zur Verfügung.

Bei Silbermengen unter 15 μg sind die Bedingungen einer mikropotentiometrischen Titration nicht mehr hinreichend erfüllbar. Wir haben deshalb für Mengen von 3 bis 15 μg Silber die photometrische Bestimmung mit p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin angewendet, wobei wir die Messung der Extinktion der kolloidalen Silberverbindung in 50%iger alkoholischer Lösung bei 550 mμ vornehmen (Abb. 1).

Das Prinzip der photometrischen Bestimmung von Bromid besteht in der Oxydation der Bromidionen mit Chloramin T zu Brom und Bromierung von Fluorescein zu Tetrabromfluorescein, dessen Extinktion gemessen wird (Abb. 2).

Zunächst wurden die Absorptionskurven von Fluorescein und Eosin gemessen. Später zeigte es sich, daß bei Anwesenheit von Chloramin aus

dem Fluorescein ein chloriertes Produkt entsteht, dessen Absorptionskurve zwischen jener des Fluoresceins und der des Eosins liegt.

Die Bildung des Eosins ist von einer Reihe von Bedingungen abhängig, bei denen bereits geringe Änderungen zu deutlichen Extinktionsabweichungen führen können.

Besonders der pH-Wert der Lösung ist während der Bromierung

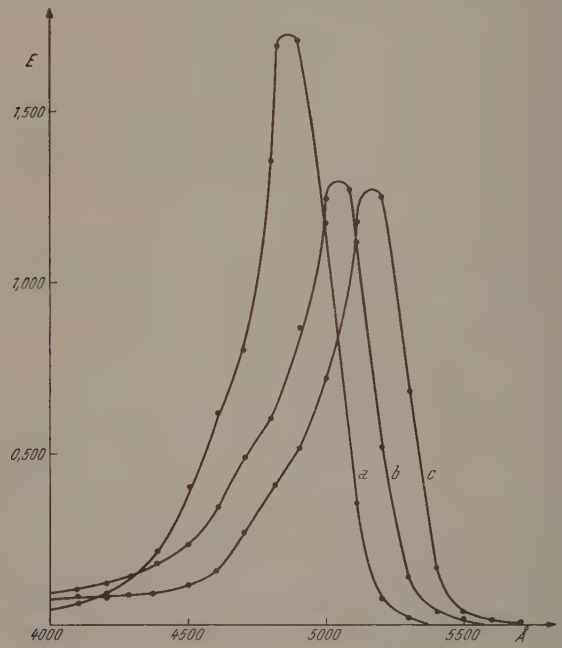


Abb. 2. Absorptionskurven von 0,004%igen Lösungen von *a)* Fluorescein, *b)* chloriertem Fluorescein, *c)* bromiertem Fluorescein; d = 10 mm, Spektralphotometer Unicam Sp 500

von sehr ausgeprägtem Einfluß. Während bei pH-Werten von etwa 3 bis 4 die Oxydation des Bromions durch Chloramin außerordentlich rasch erfolgt und das überschüssige freie Chlor das Fluorescein angreift, verläuft die Oxydation über pH 6 nur langsam. Bei einer Einwirkungszeit von 4 Minuten ist bei den von uns angewendeten Reagensmengen pH 5,5 am günstigsten.

Der Einfluß der Chloraminmenge ist ebenfalls bedeutend, wenn auch nicht in dem Maße wie der des pH-Wertes. Das Optimum liegt bei unseren Reaktionsbedingungen bei 0,01% im Gesamtvolumen.

Zur Ermittlung der optimalen Einwirkungsdauer des Chloramins

untersuchten wir bei Konstanthaltung aller übrigen Bedingungen den Einfluß der Zeit sowohl auf die Bromierung als auch auf die Chlorierung des Fluoresceins. Die bromhaltige Lösung erreicht nach etwa 2½ Minuten ein Extinktionsmaximum, das sich bis 5 Minuten Einwirkungszeit kaum verändert, um bei längerer Einwirkung langsam abzunehmen. Die günstigste Reaktionsdauer beträgt demnach 4 Minuten. Die Extinktion des chlorierten Fluoresceins erreicht bereits nach einer halben Minute der Einwirkung ein Maximum und nimmt dann kontinuierlich ab.

Die jodometrische Titration des mit Natriumhypochloritlösung zu Bromat oxydierten Bromides nach *Kolthoff* haben wir ebenfalls untersucht und für die vorliegenden Mengen dimensioniert. Mit dieser Methode ist die mikromaßanalytische Bestimmung von 1 μg Bromid aufwärts möglich. Der spezifischeren photometrischen Bestimmung ist jedoch der Vorzug zu geben, wenn größere Mengen an Chlorid neben Bromidspuren vorhanden sind. In diesem Falle treten Plusfehler durch Chlorat auf, das zwar nur sehr langsam, aber doch bereits merkbar Jod freisetzt.

Mit den beschriebenen Methoden ist es möglich, im Selen Halogenmengen von 2 μg aufwärts mit Fehlern innerhalb von 5% zu bestimmen. Falls erforderlich, kann die Empfindlichkeit der Methode durch Steigerung der Seleneinwaage bis 2 g erhöht werden. Zum Lösen dieser Selenmenge im Spitzröhrchen sind 5 ml Salpetersäure erforderlich, die man in zwei Portionen zusetzt.

Mit Hilfe derartiger Mikromethoden zur Mikro- und Spurenanalyse wird es möglich, die Reinheit außerordentlich hochgereinigter Substanzen weitgehend zu definieren bzw. den tatsächlichen Gehalt an bestimmten gewollten Zusätzen zu kontrollieren. In Verbindung mit physikalischen Untersuchungsmethoden zur Kennzeichnung der Stoffeigenschaften und mit Messungen der elektrischen Eigenschaften so definierter Stoffe kann Schritt für Schritt der Weg zur Klärung des Leitfähigkeitsmechanismus von Halbleitersubstanzen beschritten werden. Bei gewissen Stoffen stehen dieser Klärung allerdings noch erhebliche Schwierigkeiten entgegen.

Zusammenfassung

Die elektrische Leitfähigkeit von Halbleitersubstanzen ist bei Normaltemperatur vorwiegend durch den Gehalt an Fremdstörstellen im Kristallgitter der Substanz bedingt. Es sind daher Leitfähigkeitsangaben nur sinnvoll, wenn genaue Reinheitsangaben gemacht werden können. Die hierzu erforderlichen mikro- und spurenanalytischen Methoden sind bis heute nur in geringem Maße vorhanden. Besonders die Bestimmung von nichtmetallischen Verunreinigungen oder Zusätzen bereitet Schwierigkeiten.

Die Leitfähigkeit des Selens wird durch Halogene stark beeinflußt.

Es wird eine Mikromethode zur Bestimmung von Chlorid und Bromid nebeneinander im Selen beschrieben. Die Selenprobe wird in Gegenwart eines großen Überschusses von Silbernitrat in halogenfreier Salpetersäure gelöst. Die gebildeten Silberhalogenide werden mit Hydrazin in natronalkalischer Lösung reduziert. Das in Salpetersäure gelöste Silber wird potentiometrisch in einem max. Volumen von 0,5 ml mit der Membranbürette nach *Gorbach* mit 0,02-n Rhodanidlösung titriert. Brom wird photometrisch als Tetrabromfluorescein bestimmt. Aus den beiden Ergebnissen wird der Chloridgehalt errechnet. Mit dieser Methode können Halogene bis zu 0,0001% bestimmt werden.

Summary

The electrical conductivity of semi-conductors is conditioned (at normal temperature) predominantly by the content of foreign interfering substances in the crystal lattice of the material. Accordingly, conductivity data have meaning only when exact statements can be made regarding the purity. The micro- and trace analytical methods required for this are now available to only a very slight extent. The determination of nonmetallic impurities or additions presents difficulties in particular.

The conductivity of selenium is strongly affected by halogens. A description is given of a micromethod for the determination of chloride and bromide. The sample of selenium is dissolved in halogen-free nitric acid in the presence of a large excess of silver nitrate. The resulting silver halides are reduced with hydrazine in caustic soda solution. The silver is dissolved in nitric acid and titrated potentiometrically in a maximum volume of 0.5 ml with 0.02 N thiocyanate solution. A *Gorbach* membrane burette is used. Bromine is determined photometrically as tetrabromofluorescein. The chloride content is calculated from the two results. As little as 0.0001% halogen can be determined by this method.

Résumé

A la température ordinaire la conductibilité électrique d'une substance semi-conductrice est principalement fonction de la teneur en inclusions étrangères de son réseau cristallin. Il en résulte que les valeurs numériques de conductibilité n'ont de signification que lorsque l'on peut établir des données précises concernant la pureté des substances. Peu nombreuses sont les méthodes de microanalyse et d'analyse de traces, nécessaires à ces déterminations, qui existent à ce jour. En particulier, le dosage d'impuretés ou d'additions non métalliques présente des difficultés certaines. La conductibilité du sélénium est fortement influencée par les halogènes. On décrit une microméthode de dosage, dans le sélénium, des chlorure et bromure en présence l'un de l'autre. La prise d'essai de sélénium est dissoute dans l'acide nitrique exempt de chlore en présence d'un grand excès de nitrate d'argent. Les halogénures formés sont réduits par l'hydrazine en solution alcaline de soude caustique. L'argent en solution dans l'acide nitrique est titré potentiométriquement dans un volume maximum de 0,5 ml, à l'aide de la burette à membrane de *Gorbach* avec une solution de sulfocyanure 0,02 N. Le brome est déterminé par photométrie sous forme de tétrabromofluorescéine. Les deux résultats précédents permettent de calculer la teneur en chlore. On peut ainsi doser les halogènes jusqu'à une limite de 0,0001%.

Diskussion

H. *W. Nielsch* (Hannover): Könnte der Herr Vortragende seine Ausführungen dahingehend ergänzen, ob sich seine Untersuchungen auch auf Metallspuren im Selen erstreckt haben? Die Methode der Selenverdampfung, die nicht ideal ist, setze ich als bekannt voraus. Inwieweit traten hierbei Verluste an Spurenmetallen auf?

H. *F. A. Pohl:* Bei einer ganzen Reihe von Metallen ist die Gefahr eines Verlustes beim Verdampfen nicht gegeben. Man kann aber auch so vorgehen, daß man in Salpetersäure löst und die interessierenden Spuren, vor allem das Quecksilber und sonstige Metalle, die bei der Verdampfung verlorengehen könnten, extrahiert. Bis zur Klärung der Leitfähigkeit einer Substanz wie Selen müßten noch eine ganze Reihe von analytischen Untersuchungen ausgeführt werden, von denen wir heute noch nicht einmal wissen, wie wir sie angehen sollen. Z. B. wirken sich Sauerstoff-Spuren von 10^{-4} bis 10^{-5}% auf die Leitfähigkeit des Selens aus. Solche Mengen oder Feuchtigkeitsspuren in der gleichen Größenordnung zu bestimmen, bietet Schwierigkeiten, die viel größer sind, als die bei der Bestimmung aller metallischen Verunreinigungen oder auch der Halogene oder des Schwefels bis zu 10^{-4}%. Aber ohne diese Methoden wird man den Mechanismus der Leitfähigkeit nicht klären können. Und ohne diese Klärung wird es bei der Herstellung von Gleichrichtern, Modulatoren oder Transistoren die Überraschungen geben, die es jetzt gibt.

H. *A. Thiar* (Wien): Stört die Phosphorsäure bei der extraktiven Anreicherung der Spurenelemente mit Carbamat, Oxin usw.?

H. *F. A. Pohl:* Nein, sie stört nicht bei niedrigen p_H-Werten.

H. *A. Thiar:* Bis zu welchem p_H-Wert?

H. *F. A. Pohl:* Ungefähr 5.

H. *K. Pfeilsticker* (Stuttgart): Man kann neuerdings die Halogene auch spektralanalytisch nachweisen u. zw. etwa bis in die gleiche Größenordnung. Dies wäre allerdings nur interessant, wenn man den Nachweis direkt in einem Halbleiter durchführen könnte.

H. *F. A. Pohl:* Unsere spektralanalytische Abteilung arbeitet auch an der direkten spektralanalytischen Bestimmung der Halogene.

Contribution from E. I. du Pont de Nemours & Company, Inc., Polychemicals Department, Wilmington, Delaware, U.S.A.

Identification of Organic Compounds by Microscopy and X-Ray Diffractometry

By

John Mitchell, Jr., and Ada L. Ryland

With 9 Figures

(Received March 14, 1955)

The light microscope is being used in an increasing number of methods for the identification of organic compounds. Actually the several different techniques employed fall into one of three general fields: (1) methods based on crystal habit, i. e., external appearance; (2) methods based on fusion techniques; and (3) methods based on measurements of optical crystallographic constants.

Crystal habit has been proposed as the basis of methods for identifying a variety of organic compounds[1]. In most cases, however, this approach is of limited value. Either the crystals formed are not specific for a particular compound or the crystallization process is not strictly reproducible. One of the important exceptions is the test for acetic acid which forms distinctive yellow isometric tetrahedra on reaction of the sodium salt with uranyl nitrate.

The widely applicable fusion techniques for identifications of organic compounds are based on the pioneering work of *L.* and *A. Kofler* and their associates[2]. Among the many applications of their well-designed hot stage are determinations of:

(1) Simple melting points.
(2) Mixed melting points.
(3) Eutectics and phase diagrams.
(4) Polymorphism.
(5) Transition temperatures of hydrates.
(6) Addition compounds.
(7) Mixed crystal systems.

(8) Refractive indexes of melts.

(9) Molecular weights by cryoscopy[3].

The third field employs the petrographical microscope for the direct measurement of optical crystallographic constants. Several primary and secondary properties of anisotropic crystals can be determined which provide absolute proof of identification. Most of these are derived from studies of interference figures. An examination of an interference figure, such as that of muscovite, Fig. 1, will reveal the following information:

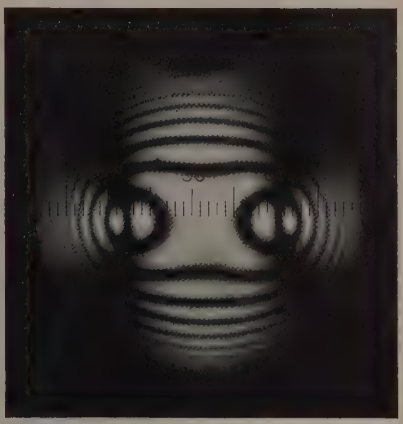


Fig. 1. Biaxial Interference Figure of Muscovite

(1) Type of figure — uniaxial or biaxial. The example shown is biaxial.

(2) Orientation — in a uniaxial crystal perpendicular, parallel, or inclined to the optic axis and in a centered biaxial crystal B_{xa}, if the section is normal to the acute bisectrix, or B_{xo}, if normal to the obtuse bisectrix.

(3) Optic axial angle — the familiar maltese cross of a uniaxial crystal, $2H$ or $2E$ of a biaxial crystal depending on whether an oil immersion or air objective is used. This is one of the most important and useful constants. The microscope is calibrated for optic axial angle measurement preferably with the aid of an Abbé apertometer[4].

(4) Optical character — plus or minus depending on the motion of the interference rings in opposite quadrants of the interference figure when a variable thickness quartz wedge, selenite or muscovite plate is moved across the field (see Fig. 2).

(5) Dispersion of the optic axes or dispersion of the bisectrices.

(6) Primary refractive index directions. Once the directions and identity of the indexes have been established on a particular section, the absolute value of the index may be determined conveniently by the immersion method with the aid of the familiar *Becke* line test.

Methods for measuring these properties have been reported in a few texts and publications[1, 4, 8]. The important use of interference figures in assigning refractive index directions has not been described adequately having been mentioned only briefly in a few texts[5, 6, 8—10]. It seems advisable to review this technique since measurements made from the assignment are the true values. In Fig. 2 is shown the motion of the isochromatic

curves on movement of a quartz wedge inserted thin end first in the tube slot above the microscope objective[10]. Their direction establishes optical

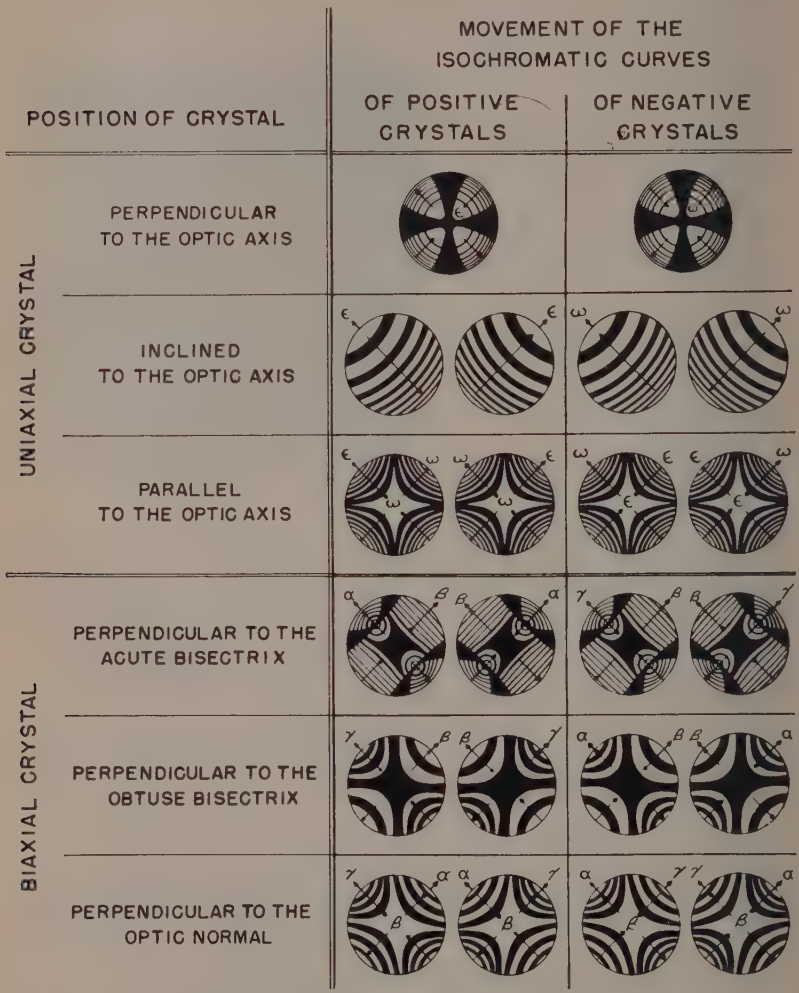


Fig. 2. Effect of Quarz Wedge on Interference Figures

character and the principal refractive index positions. This observation can be made on crystals covered by the immersion liquids. Where possible this approach should be used in preference to the extinction or trial and error methods.

Several applications of microscopy have been reported for identifications of organic compounds via crystallographic measurements. These include 3.5-dinitrobenzoates for alcohols[11]; 2.4-dinitrophenylhydrazones for aldehydes and ketones[4, 11, 12]; p-bromoanilides for carboxylic acids[13, 14]; picrates for amines[4, 15]; and miscellaneous compounds[4, 16, 17].

The major uncertainty in the use of the microscope for identification purposes is the availability of crystals which exhibit the proper orientation. Crystals which melt without decomposition can be examined as thin films from fusion or as crystals obtained on recrystallization. In the latter case the crystals usually are mounted in an inert liquid medium of high refractive index, such as Canada balsam.

The X-ray diffractometer supplies the basis for an increasingly important alternate method for identifying crystalline organic materials. Each chemical compound has a distinct X-ray pattern, characterized by the spacing of the reflections and their relative intensities. For identification purposes the powder method is most useful[18, 19]. The sample, of course, must be very finely divided to assure random orientation which will lead to clearly defined X-ray patterns containing every possible reflection. This like other instrumental methods is most conveniently handled as a comparison method. A system has been set up based on the use of diffraction angles of the three strongest lines[20–22]. X-ray data can be collected either photographically or instrumentally through use of equipment for measuring intensities, such as a Geiger counter together with recorder. The latter is more convenient and better suited for identifications.

Among the reports on the use of X-ray diffraction for identifications are direct examination of fatty acids[23], fatty acid derivatives[24–26], 2.4-dinitrophenylhydrazones[27–32], alcohol derivatives[29, 33, 34], and miscellaneous compounds[17, 35–38].

Both the petrographical microscope and X-ray diffractometer, therefore, provide important crystallographic data. They should be considered as supplementary tools for identifying crystalline materials. In laboratories where both are available the following scheme is proposed. The crystals are first examined by microscopy. If proper orientations can be found conveniently, identification can be made in a few minutes. If, however, clear measurable interference figures are not observed, the crystals are examined by X-ray diffractometry.

Most investigators consider the use of the microscope and X-ray diffractometer exclusively for qualitative analysis. Consequently an important application has been largely overlooked, that of the use of constants of mixed crystal systems for semiquantitative analyses as well as identifications. The present paper describes X-ray studies of mixtures of the p-bromoanilides of acetic and propionic acids and also of the 2.4-dinitrophenylhydrazones of acetaldehyde and propionaldehyde. The results are

compared with microscopic data reported previously and verified in the current investigation.

Experimental

Materials. — The organic chemicals were obtained from Eastman Kodak Co. with two exceptions. Glacial acetic acid was made by E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc., and thionyl chloride was purchased from Matheson, Coleman, and Bell Co.

Preparation of Derivatives. — The p-bromoanilides (pBA's) were prepared from the corresponding acids (as the acyl chlorides) and p-bromoaniline by the method of *Robertson*[39] as modified by *Kuehn* and *McElvain*[40]. After recrystallization from absolute ethanol, the propionic pBA melted at 147.1° C. An ethanol solution of the acetic pBA was treated with activated charcoal, filtered hot and allowed to crystallize. Its melting point was 168.6° C as determined on a calibrated Dennis-Parr melting point bar. *Bryant*[13] reported melting points of 147.0° and 168.8° C, respectively.

The 2.4-dinitrophenylhydrazones (2.4-D's) were made by the method of *Brady*[41] using 2.4-dinitrophenylhydrazine in alcoholic solution containing sulfuric acid. The derivatives were recrystallized from ethanol. Several recrystallizations from absolute ethanol and 60% ethanol were necessary to raise the melting point of the acetaldehyde derivative from 148.5° C to 168.2° C. This compares to a value of 168.5° C reported by *Bryant*[11]. The propionaldehyde 2.4-D melted at 155.7° C after several recrystallizations from absolute ethanol. The melting point of the propionaldehyde derivative was reported to be 155° and 156° C by *Brandstätter*[42] and *Bryant*[11], respectively.

Aqueous 2.4-dinitrophenylhydrazine reagent was used to facilitate preparation of a quantity of pure acetaldehyde 2.4-D. The reagent was made conveniently by preparing a hot saturated solution of the hydrazine in 6 N HCl. The clear supernatant liquid was decanted and the solution was allowed to cool. The yellow crystals of the hydrochloride were collected and dissolved in 3 N HCl. The derivative made using the aqueous reagent was recrystallized twice from absolute ethanol and melted at 168.6° C.

Microscopic Examination. — The derivatives were prepared and examined by techniques published previously[4, 11, 12]. Other petrographical microscopes equipped with Bertrand lens and 1.9 mm, 1.25 N. A. oil immersion objectives could have been used in place of the Bausch and Lomb LD microscope employed in these studies.

Preparation of Samples for X-Ray Examination. — Mixtures of the derivatives were made by weight and transferred to small Pyrex test tubes. The p-bromoanilide mixtures were fused over a micro burner and quenched in a dry ice-methanol bath. Because of the greater sensitivity

of the 2.4-dinitrophenylhydrazones to heat, these samples were fused carefully using an oil bath and quenched in dry ice-methanol.

The pure materials were examined both as prepared and after fusing and quenching in the same manner as the mixtures.

All the samples for X-ray examination were ground in an agate mortar to pass 400 mesh. The small particle size was necessary to prevent establishment of preferred orientation in the samples. The powders were packed from the back into aluminum sample holders in a manner similar to *McCreery*'s technique described by *Klug* and *Alexander*[18]. The technique involves packing the powder against a glass slide and subsequently removing the slide to leave a flat, unsmeared surface.

In some cases it was difficult to prepare a smooth sample surface by packing against a glass slide because the derivatives adhered to the glass when the slide was removed. In such cases the sample was packed against a flat block of du Pont "Teflon"* tetrafluoroethylene resin. The nonsticking properties of this material make it ideal for the purpose. This plastic is readily machined to give the necessary flat surface.

X-Ray Examination. — X-ray diffraction patterns were obtained using a North American Phillips Wide-Range Geiger counter diffractometer. A Norelco X-ray diffraction tube with a copper target was used to obtain the p-bromoanilide patterns. The tube was operated at 30 KV and 20 mA, and a nickel filter served to isolate the copper K_α wavelength. A chromium target Norelco tube was used for study of the 2.4-dinitrophenylhydrazones. This tube was operated at 30 KV and 10 mA and the Cr K_α wavelength was isolated by means of a metallic vanadium filter.

The scanning rate of the Geiger counter was 1°/min. The output of the counter was amplified and recorded on a strip chart which travelled at 30″/hr. (about 76 cm/hr.) For most of the work a 1° divergence slit, 1° scatter slit, and 0.006″ (about 0.15 mm) receiving slit were used. To check precise "d" spacings at low angles, ½° divergence and scatter slits were used. These conditions do not give the ultimate speed or resolution[18], but they do provide a satisfactory combination of speed, resolution and intensity, and are commonly used in the authors' laboratories for identification work.

The scaling circuit of the recorder was set to give 480 counts per second full scale on the strip chart. Peaks with greater intensities were rescanned with a higher scale factor. The time constant was 2 seconds.

The pBA samples were scanned from 2° to about 40° (2θ), while the 2.4-D samples were scanned from 2° to about 60°. The upper limits correspond to "d" spacings of about 2.25 for copper and chromium radiation, respectively. The diffractometer was calibrated with a silicon standard

* Registered U.S. Trade-mark.

for each wavelength and the recorded "d" spacings were corrected accordingly.

Discussion

Acetic and Propionic p-Bromoanilides (pBA)

A. Microscopy.

Microscopic studies of pure acetic and propionic p-bromoanilides revealed that the former exists in a stable form plus at least two metastable modifications[13]. One metastable form (II) is the first solid phase crystallizing from warm solutions of benzene, chloroform, acetic acid, and ethanol. The II form also is observed in films immediately after fusion. Within a short period the II modification is transformed into the stable form (I). On rapid quenching of the melt a second metastable form (III) is observed. Propionic p-bromoanilide exists in at least two forms in which the metastable II modification is observed in the solid from rapidly quenched melts.

Studies of mixtures of the two derivatives indicated that a mixed

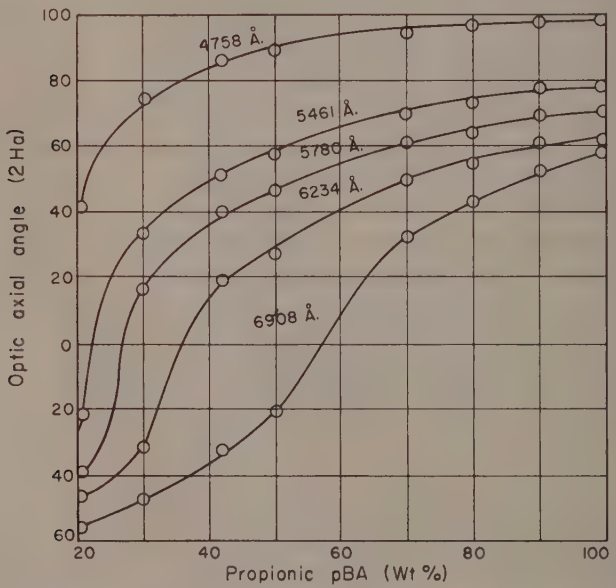


Fig. 3. Acetic-Propionic pBA System: Optic Axial Angle as Function of Composition for Several Wavelengths

crystal system is formed composed of acetic III and propionic II. Above 20% of the latter a continuous marked change in physical properties was

observed. For example, the optic axial angle varied with composition as shown in Table 1 where measurements were made at five conveniently isolated mercury lines[13].

Table 1. Optic Axial Angle for the System: Acetic-Propionic pBA

Wt. % Propionic Derivative	Optic Axial Angle, [a] $2H_a$ (Positive)				
	4538 Å	5461	5780	6234	6908
100.0	98°	78°	73°	64°	58°
89.4	96°	76°	70°	63°	55°
79.8	94°	70°	63°	54°	44°
70.0	93°	66°	59°	50°	34°
50.2	84°	56°	46°	27°	(22°)[b]
43.1	84°	50°	40°	18°	(32°)
30.1	77°	36°	15°	(33°)	(46°)
21.3	62°	(23°)	(38°)	(45°)	(55°)

[a] Precisions ± 3°, throughout.

[b] Parentheses indicate axial plane ⊥ to position for blue radiation.

Fig. 3 shows a plot of optic axial angle versus composition at each of the five wavelengths. These data are of direct value for identification and semiquantitative analysis. Of course, the results can be plotted in other ways to obtain additional useful information. Thus, the wavelength at which the optic axial angle is zero (uniaxial) can be plotted as a function of composition (Fig. 4). A plot of this type is of particular value when a calibrated monochromator is available.

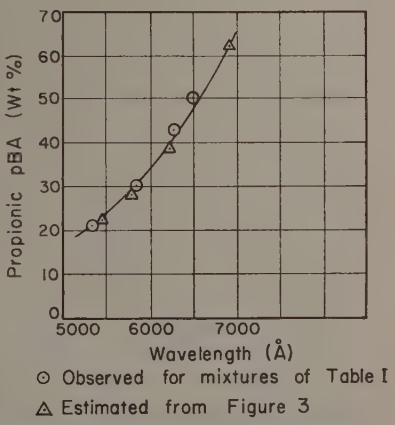


Fig. 4. Acetic-Propionic pBA System: Wavelength of Uniaxiality as Function of Composition

B. X-Ray Diffractometry.

The principal "d" spacings of the p-bromoanilide mixtures and pure derivatives are listed in Table 2. The fused and quenched mixtures, as suggested by *Bryant*[13], are solid solutions of the propionic II form and (presumably) the acetic III modification. These two forms do not appear to be isomorphous. The authors were not able to obtain X-ray patterns of the acetic II and III pBA's because these modifications reverted to the stable form very rapidly. In an attempt to obtain the pattern of the acetic III form,

Table 2. Principal "d" Spacings and Intensities of Acetic-Propionic p-Bromoanilide System

Wt. % Propionic Derivative	A	B	C	D[a]
0.0 (Acetic I) ..	3.42 (100)	3.67 (76)[b]	4.72 (63)	6.51 (6)
1.1	4.07 (100)	3.52 (97)[b]	5.77 (35)	11.65 (22)
5.4	3.51 (100)[b]	4.06 (80)	5.73 (46)	11.41 (29)
10.0	4.06 (100)	3.52 (77)[b]	5.73 (47)	11.44 (29)
20.0	4.70 (100)[b]	4.06 (100)	3.63 (98)[b]	11.44 (30)
29.9	3.64 (100)[c]	5.62 (50)[b]	5.50 (34)[b]	5.62 (50)[b]
40.0	3.65 (100)	5.60 (35)[b]	5.48 (27)[b]	7.56 (8)
50.0	3.68 (100)	5.60 (29)[b]	5.24 (24)[b]	10.52 (8)
60.1	3.70 (100)	5.25 (26)[b]	5.61 (25)[b]	10.52 (5)
69.9	3.73 (100)	5.62 (35)[b]	5.30 (29)[b]	10.62 (4)
80.0	3.74 (100)	5.59 (19)[b]	5.28 (17)[b]	7.80 (4)
89.3	3.76 (100)	5.60 (25)[b]	3.28 (23)[b]	7.80 (6)
Propionic II ...	3.78 (100)	3.53 (44)[b]	5.05 (30)	7.91 (6)
Propionic I	4.75 (100)	3.53 (97)[b]	3.63 (90)[b]	10.64 (32)[b]

[a] Longest spacing.

[b] Intensity values do not represent the true intensity of the peak because of contributions from overlapping reflections. Intensities were measured from background to the maximum of the peak.

[c] Probably a combination peak of several closely spaced reflections which were not resolved.

a sample was quenched and a powder photograph was taken in a 57.3-mm Philips X-ray camera. About thirty minutes elapsed from the quench time until the end of the exposure, and the pattern showed primarily the stable form. The mixture containing 1.1% propionic pBA gave an X-ray pattern distinctly different from the acetic I form, and the authors believe that this approximates the pattern of the acetic III modification. The phenomenon of stabilization of a metastable modification by a small amount of impurity is not uncommon. The propionic II form was comparatively quite stable. Its X-ray pattern did not change over a twenty-four hour period.

Mixtures containing 30% or more of the propionic derivative crystallized in the propionic II form. The patterns were virtually identical except for a slight increase in the principal "d" spacing as the concentration of propionic pBA increased. The values are plotted in Fig. 5. Although the change was only 0.14 Å, the angular shift was about 0.5° (θ) using Cu K_α radiation. Identification and semiquantitative estimation of the compositions of mixtures can be made based on this shift. Estimation would be facilitated, however, by lowering the scanning speed to reduce measuring errors. The angular variation could also be increased

by the use of longer wavelength radiation. In preliminary studies on this system, the authors used chromium radiation because of its greater dispersion, but an undesirable high background scattering was observed which was probably caused by the bromine atom. This would probably not interfere, however, with semiquantitative estimates of composition, and more reliable results could be obtained.

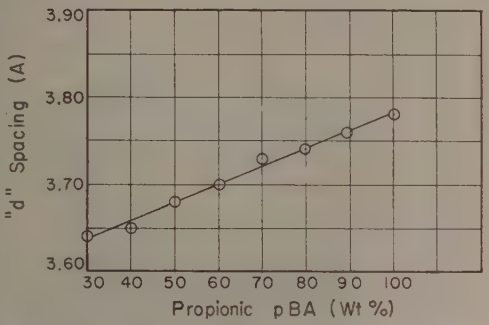


Fig. 5. Acetic-Propionic pBA System: Shift in Principal "d" Spacing with Composition

Mixtures containing less than 30% propionic pBA crystallized in the acetic III form. These patterns differed greatly in the intensities of the reflections, although the "d" spacings were much the same. The spacing of 4.06 Å appears between 0 and 20% propionic pBA. The intensity ratio of the 4.06 Å peak to that of the 3.63 Å peak which occurs in all mixtures is plotted in Fig. 6. This ratio should offer a possibility for semiquantitative estimation of the composition if care is taken to avoid preferred orientation.

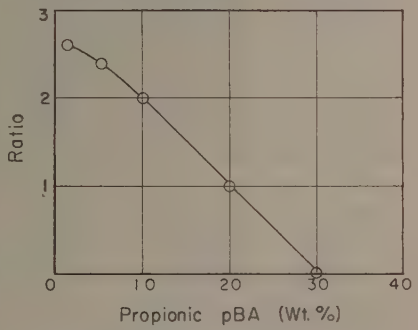


Fig. 6. Acetic-Propionic pBA System: Intensity Ratio (4.06/3.63 Å) as Functon of Composition

The X-ray results correspond very well with the optical data. In the region of 30 to 100% propionic pBA where the optic axial angle increases gradually, the X-ray data show the same crystal structure with gradually increasing spacings. The sharp break in the optic axial angle plot at about 30% surely reflects the change in structure observed in the X-ray patterns.

Acet- and Propion-2.4-Dinitrophenylhydrazones (2.4-D)

A. Microscopy

Acet- and propion-2.4-D's also form a mixed crystal system. Like the pBA mixtures certain of the optical properties vary with composition[4]. This is evident from Fig. 7 which shows a plot of optic axial

angle versus per cent propionaldehyde. It is interesting to note that with this system also crossed axial plane dispersion is observed, permitting a plot of wavelength of uniaxiality versus composition (Fig. 8). For semi-quantitative analyses these microscopic data are limited to the range from 0 to about 40% propionaldehyde. Higher concentrations have no marked effect on optic axial angle. The abrupt change in the neighborhood of 80% propion-2.4-D suggests a phase change. This is not borne out by the X-ray data, however.

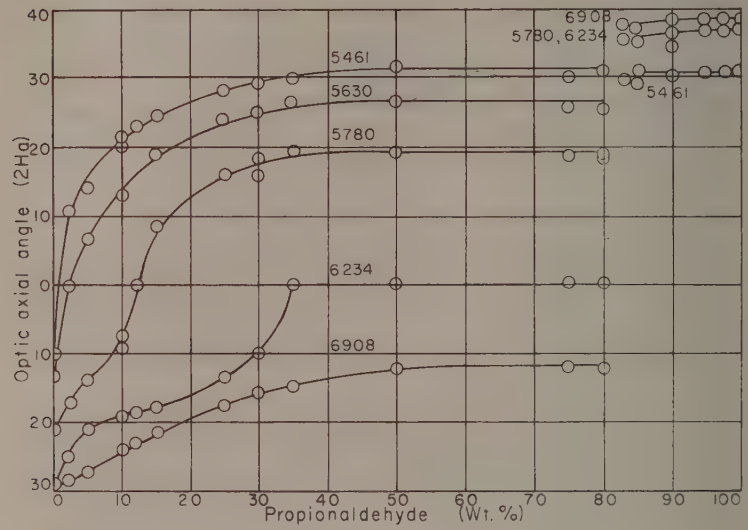


Fig. 7. Acet-Propion-2.4-D System: Optic Axial Angle as Function of Composition of Several Wavelengths

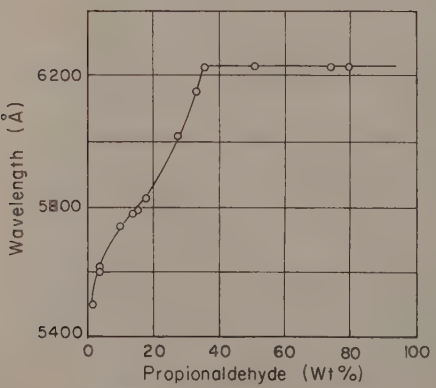


Fig. 8. Acet-Propion-2,4-D System: Wavelengths of Uniaxiality as Function of Composition

B. X-Ray Diffractometry

The principal spacings of the 2.4-D mixtures and pure derivatives are listed in Table 3. The fused and quenched mixtures are solid solutions of the acetaldehyde (II)

2.4-D and the propionaldehyde derivative, which are isomorphous. A fused and quenched sample of propionaldehyde 2.4-D showed the presence of some of the spurious II form, but this was not observed in the patterns of any of the mixtures. Spacings of the acetaldehyde 2.4-D which melted at 148.5°C were identical with these of form I (m. p. 168.6°C).

Table 3. Acet-Propion-2.4-Dinitrophenylhydrazone System: Principal "d" Spacings and Intensities

Wt. % Propionaldehyde Derivative[a]	A	B	C	D[b]
0 (Acet I)	9.41 (100)	4.72 (17)	3.23 (17)	9.41 (100)
0 (Acet II) ...	3.22 (100)	9.22 (71)	5.42 (17)	9.22 (71)
10	3.22 (100)	9.33 (66)	5.46 (15)	9.33 (66)
20	3.23 (100)	9.42 (90)	5.50 (18)	9.42 (90)
30	3.24 (100)	9.48 (71)	5.54 (13)	9.48 (71)
35	3.24 (100)	9.53 (81)	5.56 (16)	9.53 (81)
40	3.24 (100)	9.54 (80)	5.58 (17)	9.54 (80)
50	3.24 (100)	9.57 (89)	5.61 (16)	9.57 (89)
60	3.25 (100)	9.60 (80)	5.65 (15)	9.60 (80)
70	3.25 (100)	9.63 (74)	5.68 (12)	9.63 (74)
80	3.25 (100)	9.63 (70)	5.70 (10)	9.63 (70)
85	3.26 (100)	9.64 (80)	5.72 (15)	9.64 (80)
90	9.64 (100)	3.26 (90)	5.74 (18)	9.64 (100)
100	3.26 (100)	9.66 (98)	5.77 (22)	9.66 (98)

[a] *Bell*[27] studied mixtures containing 25% and 2% propionaldehyde 2.4-D and observed similar changes, but reported no "d" spacings for comparison.

[b] Longest spacing.

Fig. 9 shows the changes in two of the "d" spacings with composition. Although most of the change in the longest spacing occurs below 40% propionaldehyde 2.4-D, the change in the shorter spacing shows almost a straight line relationship. These two spacings should permit estimation of the composition of mixtures with reasonable accuracy.

Again, the agreement between the X-ray and optical data is remarkable. The optical data seem to reflect primarily the variation in the longest spacing, since the major change in optic axial angle occurs below 35% propionaldehyde 2.4-D. No major effect is observed in the X-ray patterns to correspond to the break at 82.5 per cent in the optical data, but above this composition there is an indication that some of the propionaldehyde 2.4-D may be present as a distinct phase.

The above discussion of the microscopic and X-ray diffractometric properties of mixed systems illustrates quite clearly the potential of these techniques. Doubtless other systems could be chosen which would

display larger changes in a property with composition but few offer the numerous possibilities given by these polymorphs. In many cases other techniques, such as melting point, also could be used. The crystallographic data are often more positive than other constants, however, since they are unaffected by small concentrations of foreign materials.

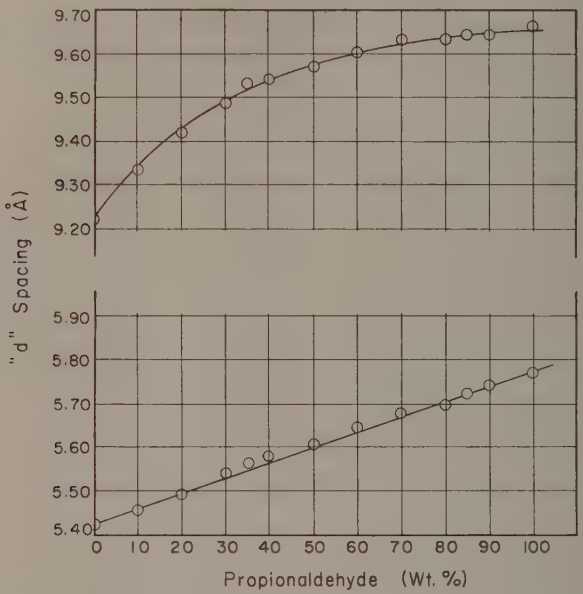


Fig. 9. Acet-Propion-2.4-D System: Shifts in "d" Spacings with Composition

Summary

Primary and secondary crystallographic constants can be utilized conveniently for identifications of crystalline organic and inorganic materials by microscopy and X-ray diffractometry. Several specific properties can be measured under the petrographical microscope, including optic axial angle, character, dispersion, and in addition, refractive index directions can be established. The "d" spacings and their intensities as determined with the X-ray diffractometer serve to identify crystalline materials. The two instruments should be considered as supplementary tools for identifying crystals.

Both instruments supply a means for identification and semiquantitative analysis of mixed crystal systems. Data are presented for the systems: acetic-propionic p-bromoanilides and acet-propion-2.4-dinitrophenylhydrazones.

Zusammenfassung

Primäre und sekundäre kristallographische Konstanten können zur Identifizierung kristallisierter organischer und anorganischer Stoffe auf mikroskopischem Wege und durch Röntgendiffraktometrie gut herangezogen werden. Einzelne spezifische Eigenschaften können unter dem petrographischen Mikroskop gemessen werden, so der optische Achsenwinkel, der Charakter, die Dispersion. Außerdem kann man Angaben über den Brechungsindex erhalten. Die mit dem Röntgendiffraktometer bestimmten Netzebenenabstände „d" und deren Intensitäten dienen zur Identifizierung kristallisierter Stoffe. Die beiden Instrumente sind als Hilfsmittel zur Erkennung von Kristallen anzusehen.

Sie bieten die Möglichkeit zur Identifizierung und halbquantitativen Analyse von Mischkristallsystemen. Daten für die Systeme Essigsäure-Propionsäure-p-Bromanilid und Acetaldehyd-Propionaldehyd-2,4-Dinitrophenylhydrazon werden mitgeteilt.

Résumé

Les constantes cristallographiques primaires et secondaires sont utilisables pour l'identification de composés cristallins organiques et minéraux par microscopie et diffractométrie de rayons X. Il est possible de mesurer diverses propriétés spécifiques sous le microscope pétrographique, savoir: l'angle des axes optiques, le caractère et la dispersion optiques. Il est en outre possible de déterminer les directions des indices de réfraction primaires. Les espacements «d» et leurs intensités déterminés par le diffractomètre à rayons X permettent d'identifier les substances cristallines. Les deux instruments doivent être considérés comme complémentaires pour l'identification de cristaux. Chacun d'entre eux fournit un moyen d'identification et d'analyse semi quantitative des systèmes de cristaux mixtes. On rend compte de résultats obtenus pour les systèmes: p-bromoanilides acétique et propionique ainsi que 2, 4-dinitro phénylhydrazones de l'acétaldéhyde et du propionaldéhyde.

References

[1] *E. M. Chamot* and *C. W. Mason*, Handbook of Chemical Microscopy, 2nd ed., Vol. II. New York: Wiley. 1940.

[2] *L. Kofler* and *A. Kofler*, Thermo-Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Universitätsverlag Wagner. 1954.

[3] *M. Brandstätter*, Mikrochem. **36/37**, 291 (1951).

[4] *J. Mitchell*, Jr., Analyt. Chemistry **21**, 448 (1949).

[5] *N. H. Hartshorne* and *A. Stuart*, Crystals and the Polarizing Microscope. London: Edward Arnold Co. 1934.

[6] *A. F. Rogers* and *P. F. Kerr*, Thin-Section Mineralogy. New York: McGraw-Hill Book Co. 1933.

[7] *E. E. Jelley*, J. Royal Microscop. Soc. **52**, 93 (1942).

[8] *A. Johannson*, Manual of Petrographic Methods, 2nd ed. New York: McGraw-Hill Book Co. 1918.

[9] *T. R. P. Gibb*, Optical Methods of Chemical Analysis. New York: McGraw-Hill Book Co. 1942.

[10] *H. Rosenbusch* and *E. A. Wülfing*, Mikroskopische Physiographie, 5th ed., Vol. I, Pt. 1, No. 1. Stuttgart: E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung. 1922.

[11] *W. M. D. Bryant*, J. Amer. Chem. Soc. **54**, 3758 (1932); **55**, 3201 (1933); **58**, 2335 (1936); **60**, 2814 (1938).

[12] *L. I. Braddock, K. Y. Garlow, L. I. Grimm, A. F. Kirkpatrick, S. W. Pease, A. J. Pollard, E. F. Price, T. L. Reissmann, H. A. Rose*, and *M. L. Willard*, Analyt. Chemistry **25**, 301 (1953).

[13] *W. M. D. Bryant*, J. Amer. Chem. Soc. **60**, 1394 (1938).

[14] *W. M. D. Bryant* and *J. Mitchell*, Jr., J. Amer. Chem. Soc. **60**, 2748 (1930).

[15] *J. Mitchell*, Jr. and *W. M. D. Bryant*, J. Amer. Chem. Soc. **65**, 128 (1943).

[16] *A. N. Winchell*, The Optical Properties of Organic Compounds, 2nd ed. New York: Academic Press, 1954.

[17] *W. C. McCrone* and co-workers, Analyt. Chemistry, monthly reports.

[18] *H. P. Klug* and *L. E. Alexander*, X-Ray Diffraction Procedures. New York: Wiley. 1954.

[19] *J. M. Bijvoet, N. H. Kolkmeyer* and *C. H. MacGillavry*, X-Ray Analysis of Crystals. New York: Interscience Publishers. 1951.

[20] *J. D. Hanawalt* and *H. W. Rinn*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **8**, 244 (1936).

[21] *J. D. Hanawalt, H. W. Rinn* and *L. K. Frevel*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **10**, 457 (1938).

[22] *L. K. Frevel*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **16**, 209 (1944).

[23] *F. B. Slagle* and *E. Ott*, J. Amer. Chem. Soc. **55**, 4404 (1933).

[24] *K. Hess* and *H. Kiessig*, Chem. Ber. **81**, 327 (1948).

[25] *F. W. Matthews, G. G. Warren* and *J. H. Michell*, Analyt. Chemistry **22**, 514 (1950).

[26] *F. W. Matthews* and *J. H. Michell*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **18**, 662 (1946).

[27] *F. O. Bell*, Biochemic. J. **35**, 312 (1941).

[28] *G. L. Clark, W. I. Kaye* and *T. D. Parks*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **18**, 310 (1946).

[29] *J. J. de Lange* and *J. P. W. Houtman*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **65**, 891 (1946).

[30] *T. Malkin* and *T. C. Tranter*, J. Chem. Soc. London **1951**, 1178.

[31] *B. E. Gordon, F. Wopat, Jr., H. D. Burnham*, and *L. C. Jones, Jr.*, Analyt. Chemistry **23**, 1754 (1951).

[32] *F. W. Neuman* and *C. W. Gould*, Analyt. Chemistry **25**, 751 (1953).

[33] *J. B. McKinley, J. E. Nickels* and *S. S. Sidhu*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **16**, 304 (1944).

[34] *G. G. Warren* and *F. W. Matthews*, Analyt. Chemistry **26**, 1985 (1954).

[35] *L. L. Merritt, Jr., H. B. Cutter, H. R. Golden*, and *E. Lanterman*, Analyt. Chemistry **22**, 519 (1950).

[36] *C. W. Gould* and *S. T. Gross*, Analyt. Chemistry **25**, 749 (1953).

[37] *D. W. Moore* and *L. A. Burkardt*, Analyt. Chemistry **26**, 1917 (1954).

[38] *H. S. Kaufman* and *I. Fankuchen*, Analyt. Chemistry **26**, 31 (1954).

[39] *P. W. Robertson*, J. Chem. Soc. London **115**, 1210 (1919).

[40] *M. Kuehn* and *S. M. McElvain*, J. Amer. Chem. Soc. **53**, 1173 (1931).

[41] *O. L. Brady*, J. Chem. Soc. London **1931**, 756.

[42] *M. Brandstätter*, Mikrochem. **31**, 33 (1944).

Imperial Chemical Industries (Dyestuffs Division), Research Laboratories, Manchester

The Use of the Mass Spectrometer for the Identification of Organic Compounds

By

J. H. Beynon

With 9 Figures

(Received March 8, 1955)

The mass spectrometer has been in use for many years for the quantitative analysis of mixtures of known hydrocarbons, but its use for the qualitative analysis of organic compounds is still not widely appreciated. The method consists in the bombardment of the vapour of the substance being examined, at a pressure of 10^{-5} to 10^{-6} mm mercury, with electrons having energies of 50 or 100 electron volts. These electrons can not only ionize the molecules of vapour, but can break them down in a variety of ways, forming positive and negative ions and neutral fragments. The positive ions are sorted by the mass spectrometer on the basis of their mass to charge ratios, and the mass spectrum consists of a plot of the relative abundances of the various ion species against their mass to charge ratios. The mass spectrum is characteristic of the substance being bombarded and can therefore be used for its identification; this paper sets out the method by which, with the aid of empirical rules based on a large number of mass spectra, the molecular structure can be deduced in many cases from the mass spectrum. Experience of this method over the past four years has shown it to be an extremely powerful technique.

A typical mass spectrum, that of cyclohexane, is shown in Fig. 1.

Any substance of sufficient thermal stability to give a vapour pressure of 10^{-5} to 10^{-6} mm without decomposition can be examined by this method. The amount of substance required is small, and the above pressures can be maintained in the ionization chamber for several hours using less than a milligramme of sample, while a good deal of useful information can often be obtained on samples many times smaller than this.

The method of introduction of the various samples submitted for mass spectrometric analysis varies with the volatility of the sample and the information required. Samples boiling below about 150°C are examined by first completely evaporating them, and then feeding their

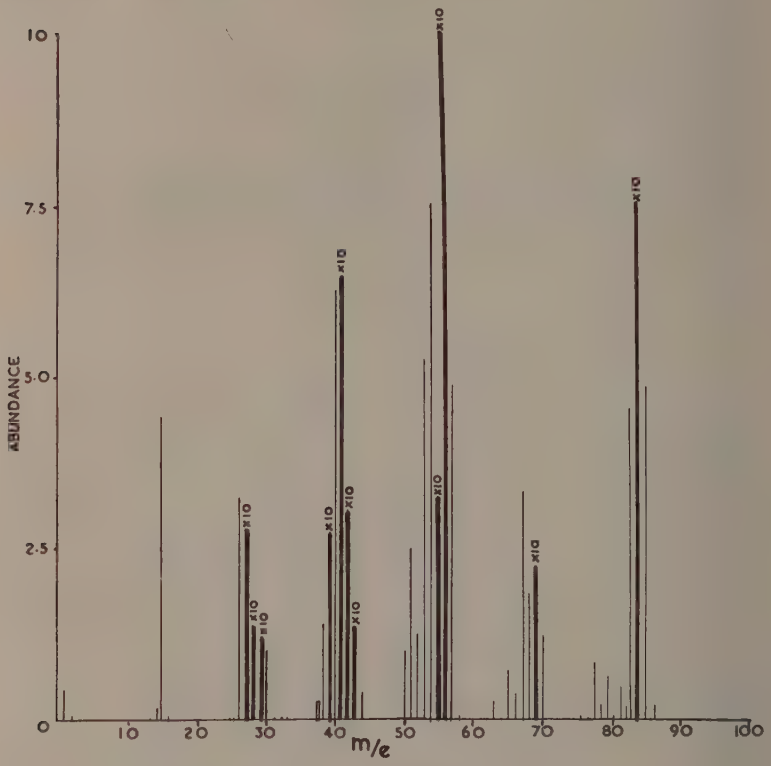


Fig. 1. Cyclohexane

vapour, at a pressure of perhaps 1 mm Hg, through a porous leak into the ionization chamber, the leak reducing the sample pressure to the required level. Samples less volatile than this can be examined in a similar manner, but then, the sampling handling system must be heated so as to bring the sample completely into the vapour phase. For quantitative work, it is usual to vaporize the whole sample, so that the vapour then has the same composition as the starting material, which may have been a liquid or solid.

Occasionally, however, other ways of introducing the sample are

preferable. For example, if a known compound contains a small amount of more volatile impurity the vapour pressure of the impurity can be enhanced relative to that of the main substance by reducing the temperature of examination as far as possible. This can be achieved by connect-

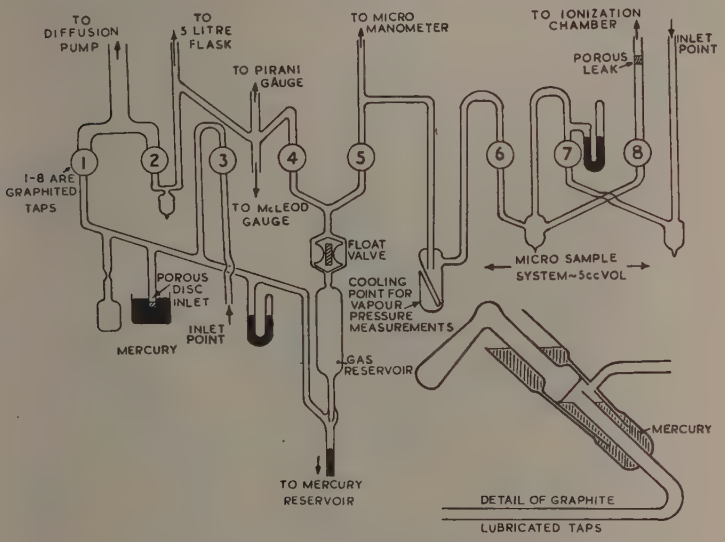


Fig. 2. Gas-Sample Handling System

ing the sample directly to the ionization chamber (i. e. without an intervening leak) and adjusting the sample temperature to give a vapour pressure of 10^{-5} to 10^{-6} mm Hg. A schematic diagram of the sample handling system is shown in Fig. 2, together with a sketch of one of the vacuum taps used. All taps and conical joints used in the system are lubricated with graphite and sealed with mercury to prevent loss of the samples being examined, and 'memory' effects due to absorption. Some of the methods used for introducing samples to the sample system, including a 'break-off' type vacuum septum for introduction of samples directly to the ionization chamber are shown in Fig. 3.

As in other methods of chemical analysis, identification is usually simpler when the substance being examined is pure, but mass spectrometry has the advantage over conventional methods of analysis that it is usually possible to determine from the mass spectrum whether the substance being examined is a mixture or not, and in simple cases it is often possible to identify each component directly from the mass spectrum. A simple case where this is possible is shown in Fig. 4 which

is the spectrum of a mixture of cyclohexane and benzene. This spectrum obiously contains a compound of molecular weight 84, and, in addition, the strong peak at mass 78 means either the ready loss of six hydrogen atoms from this substance, which is extremely unlikely, or the presence of a second substance of molecular weight 78.

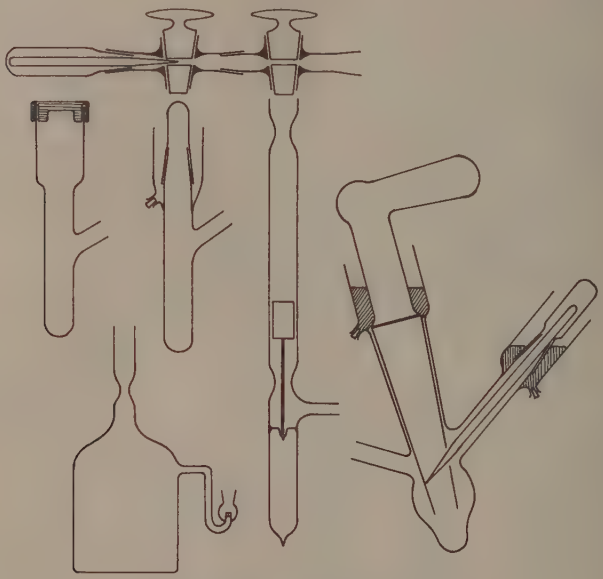


Fig. 3. Methods of Sample Insertion

Usually, however, the identification of all compounds present in a mixture is an extremely difficult problem, and the mixture is, therefore, usually separated as well as possible into its components before examination. When there is only a small amount of the substance available, vapour-phase chromatography is often an ideal method of separation, and since it can operate on samples of about 10 mg quantity and can be used with samples boiling up to about 350°C, it can be employed for separations of most substances volatile enough to give a mass spectrum. The system which we use for separating compounds boiling below about 130°C is shown schematically in Fig. 5. It employs two platinum wire catharometers, arranged in two of the arms of a Wheatstone bridge, for detection of the vapours issuing from the chromatograph column, and seven collectors for trapping the various constituents of the mixture as they emerge from the column. The collector used for a particular

fraction is selected by manipulating the ball-bearing operated valves, and the narrow glass tubes in which the samples are condensed are sealed

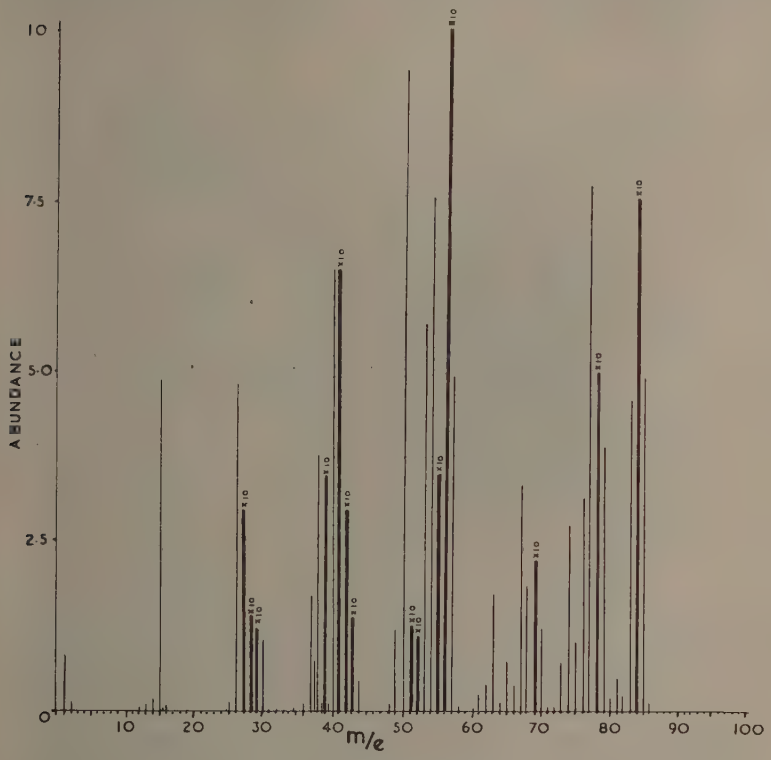


Fig. 4. Cyclohexane + Benzene

off for examination later in the mass spectrometer. Two of the collectors are shown in the figure.

A typical chromatogram obtained by this method is shown in Fig. 6, together with the results of mass spectrometric analysis. It can be seen that in this case, many of the components were not resolved by the chromatograph. When this occurs, it is usual to collect only the skirts of the peaks and to pump away the main, unresolved portion of each peak, as a means of increasing the resolution. It is worth noting that in case any of the apparently 'blank' regions of the chromatogram contain very small peaks due to impurities, gas from these regions of the spectrum is usually passed through a collector and sealed for mass spectro-

metric analysis, since the mass spectrometer is so much more sensitive than the chromatograph.

Having considered the apparatus necessary for the handling and purification of samples to be analysed by mass spectrometry, we will

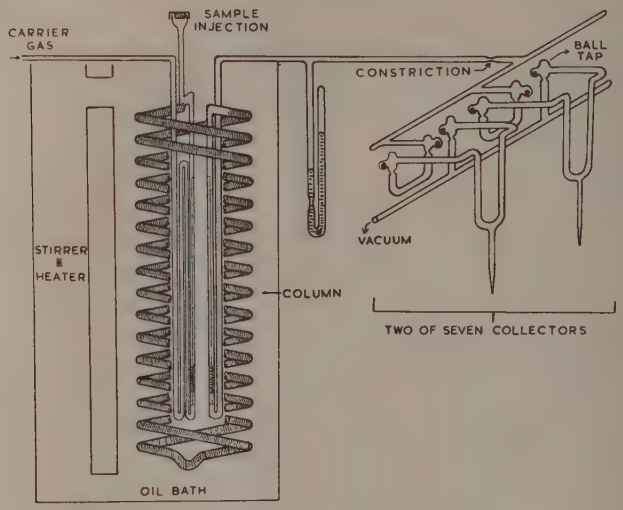
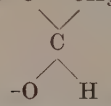


Fig. 5. Schematic Diagram of Vapour Phase Chromatograph

now consider in detail the method of deducing a molecular structure from the mass spectrum.

The most important single item of information required in identification of a compound by mass spectrometry is the molecular weight, and the mass spectrometer is unique amongst analytical methods in being able to provide this information very accurately. Since the vapour pressures used in the ionization chamber are so low and the system is continuously pumped, the mean free path for collisions is of the order of 1000 cm, and collisions between molecules or ions are very unlikely. It can, therefore, be assumed that no ions heavier than a complete molecule (excluding heavy isotopes) can be formed, and that the mass of the heaviest ion gives the molecular weight. Certain groups in a molecule, such as  , or several halogen atoms can lead to such small 'parent' ions that they can be overlooked. Such cases are not dealt with in this

paper, but can usually be recognized from accurate mass or isotopic abundance measurements, or from unlikely mass differences in the remainder of the mass spectrum. Knowledge of the molecular weight immediately eliminates all but a small number of possible empirical

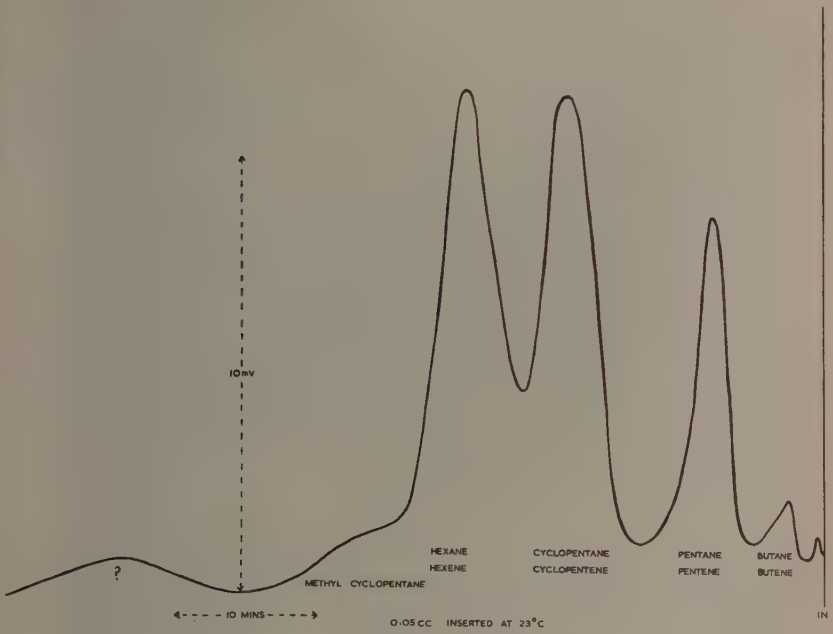


Fig. 6. Typical Chromatogram

formulae. For example, an organic compound of molecular weight 84 would, of necessity, have the composition C_6H_{12}, $C_4H_8N_2$, $C_2H_4N_4$, C_5H_8O, $C_4H_4O_2$ or $C_4H_4N_2O$. Compounds containing chlorine and sulphur have not been included in the above list, since their presence is usually apparent from the isotopic abundance ratios, though their inclusion would only mean the addition of a small number of formulae to the above list. It is interesting that the molecular weight also gives information on the number of nitrogen atoms present. All compounds of carbon, hydrogen, oxygen, the halogens, silicon, sulphur, phosphorus, arsenic, having an odd molecular weight must contain an odd number of nitrogen atoms. This is due to the fact that nitrogen is the only one of the above elements whose atomic weight and valency are neither both even nor both odd.

But if the mass of the 'parent' ion is measured even more accurately, the number of possible empirical formulae can be still further restricted. Since the masses of the elements are not exactly integral multiples of a unit mass, a sufficiently accurate mass measurement alone enables the elemental composition of the ion to be determined.

Further, since the relative abundances of the natural isotopes are different for the different elements it is possible to distinguish between the various possible empirical formulae for the parent ion by measurement of the isotopic abundances, and comparison of these values with those of all possible combinations of the elements. In Table 1 are shown values of masses and isotopic abundances for all such possible combinations for an ion of mass 84 (whether a parent ion or not), showing the order of accuracy required in the various measurements. The isotopic ratios must be used with great caution, since a very small impurity peak isobaric with one of the isotopes can lead to large errors in the isotopic abundance ratios. Mass measurement has been found useful on numerous occasions. In one instance, a milligramme quantity of material, for which the ultimate chemical analysis had proved inconclusive, was shown to be a mixture of two compounds of molecular weights 201 and 196 respectively, which had empirical formulae of $C_{14}H_{19}N$ and $C_{13}H_{24}O$. The fragmentation peaks in the mass spectra enabled both compounds to be identified from their mass spectra alone.

Table I.

Formula	Mass	$\frac{P_{m+1}}{P_m}$	$\frac{P_{m+2}}{P_m}$	$\frac{P_{m+1}}{P_{m+2}}$
$C_2H_2N_3O$	84.0466	$3.38 \cdot 10^{-2}$	$2.44 \cdot 10^{-3}$	13.9
$C_2H_4N_4$	84.0705	$3.75 \cdot 10^{-2}$	$5.58 \cdot 10^{-4}$	67.3
$C_3H_2NO_2$	84.0354	$3.73 \cdot 10^{-2}$	$4.52 \cdot 10^{-3}$	8.3
$C_3H_4N_2O$	84.0592	$4.11 \cdot 10^{-2}$	$2.66 \cdot 10^{-3}$	15.5
$C_3H_6N_3$	84.0831	$4.48 \cdot 10^{-2}$	$8.07 \cdot 10^{-4}$	55.5
$C_4H_4O_2$	84.0480	$4.46 \cdot 10^{-2}$	$4.77 \cdot 10^{-3}$	9.4
C_4H_6NO	84.0718	$4.84 \cdot 10^{-2}$	$2.93 \cdot 10^{-3}$	16.5
$C_4H_8N_2$	84.0956	$5.21 \cdot 10^{-2}$	$1.11 \cdot 10^{-3}$	46.9
C_5H_8O	84.0844	$5.57 \cdot 10^{-2}$	$3.26 \cdot 10^{-3}$	17.1
$C_5H_{10}N$	84.1082	$5.94 \cdot 10^{-2}$	$1.47 \cdot 10^{-3}$	40.5
C_6H_{12}	84.1208	$6.68 \cdot 10^{-2}$	$1.88 \cdot 10^{-3}$	35.6

Mass measurements also prove useful when studying the fragment peaks in the mass spectrum, for by giving the elemental composition of such peaks, they give a good deal of information about the arrangement of the atoms within the molecule. However, the factors governing the modes of breakdown of organic compounds under electron bombardment are not understood so that qualitative analysis by this method has also

to be based on empirical relationships derived from examination of large numbers of mass spectra. Thus, in Fig. 7 are shown plotted the mass

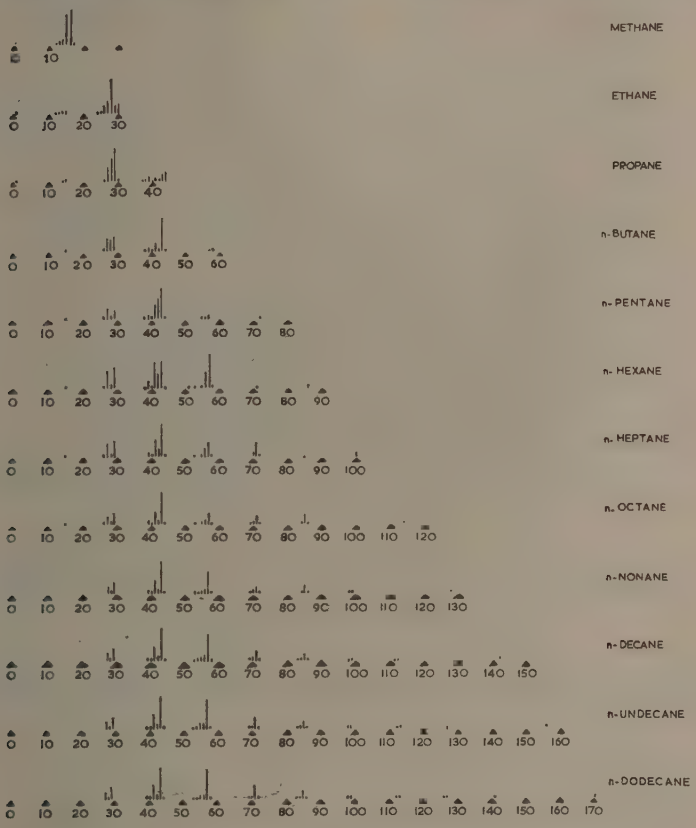


Fig. 7

spectra of some linear paraffins, and it can be seen that for compounds larger than C_4, the ion peak 43 ($C_3H_7^+$) is always very large. In fact, this ion peak tends to be large for all paraffins, and occurs strongly even for compounds such as neo-hexane where several bonds have to be broken, and re-arrangement of hydrogen atoms must take place for its formation. The presence of a large peak at mass 43 would, therefore, suggest the presence of higher alkyl groups. In the same way, other mass peaks can be used to identify certain terminal groups. Thus, mass 30 is always large for primary amines, masses 31, 45, 59 indicate the presence of

oxygen as alcohol or ether, mass 19 or 33 indicates an alcohol, mass 60 indicates a monobasic carboxylic acid, masses 91 and 77 indicate the presence of a benzene ring, and so on. Further information based on the general form of the spectrum can also be obtained from general rules such as the following:

1. A substance having a strong parent peak in its mass spectrum contains a ring, and in general, the stronger the ring, the larger the parent peak. The reverse of this rule does not hold true and many ring compounds having very small parent peaks are known.

2. The mass spectrum of a compound containing a highly substituted ring will usually contain peaks at low mass numbers characteristic of the ring, which enable it to be identified.

3. For a saturated ring, the peak corresponding to loss of two ring atoms is much larger than that for loss of one ring atom.

4. Mono-substituted ring compounds give a large positive ion peak corresponding to fracture at the ring if the ring is saturated, but the prominent peak corresponds to fracture at the bond next but one to the ring if the ring has a double bond next to the side-chain.

5. Arising partly from this rule is the rule that compounds tend to break β to a —C=C— double bond.

6. Compounds containing a $\begin{matrix} O \\ \| \\ C— \end{matrix}$ group tend to break at this group, $\begin{matrix} O \\ \| \\ —C— \end{matrix}$ that portion of the molecule which includes the group retaining the positive charge.

7. Compounds containing certain groups or large numbers of atoms such as — Cl, have very small peaks.

8. Some of the rules can be used to distinguish between isomers. For example, the C_8H_{18} paraffin $\begin{matrix} & & C & & \\ & & | & & \\ C— & C & -C— & C— & C \\ & & | & & \\ & & C & & \end{matrix}$ would tend to break only at the branches, and thus to lose 1 or 4 carbon atoms rather than 2 or 3. Of the other C_8H_{18} paraffins, the normal paraffin would tend to have the strongest parent peak, and the highly branched isomers, especially those with two or more methyl groups substituted on a single carbon atom would tend to have very small parent peaks and to lose one of the methyl groups very readily.

An example of the use of these rules to identify an unknown substance is provided by the partial mass spectrum shown in Fig. 8. This compound

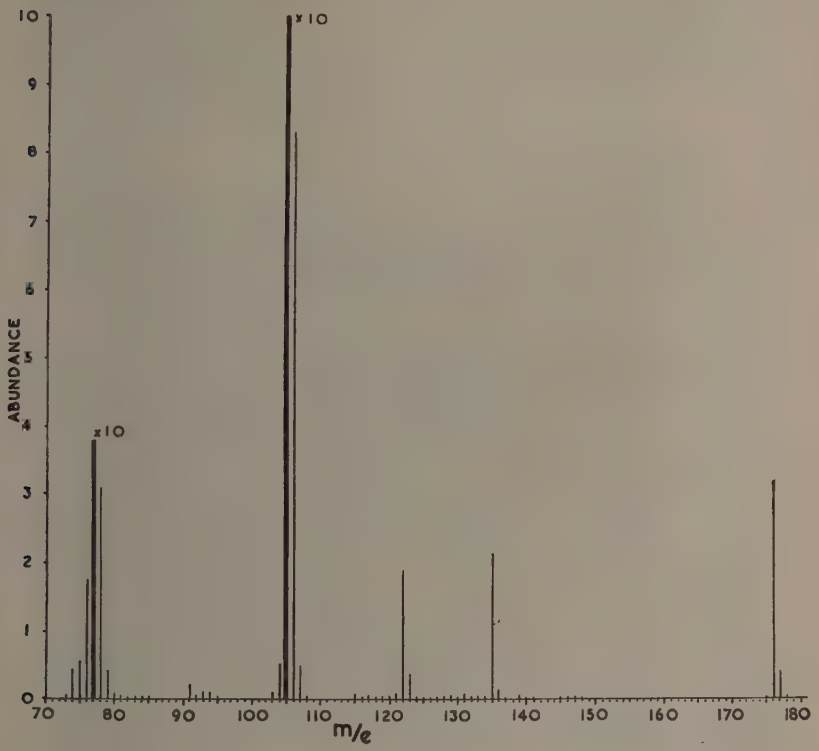


Fig. 8

has the molecular weight 178, and by accurate mass measurement and the isotopic abundance ratios, it was shown to have the formula $C_{11}H_{12}O_2$. It has a fairly strong parent peak, suggesting the presence of a ring and loses mass 41 to form the peak 137, but does not lose, for example, 15 or 17 as it might be expected to do if it contained, say, methyl or hydroxyl as its terminal group. This suggests the terminal group to be double-bonded, and since compounds containing C=C double bonds tend to break β to such bonds it is reasonable to suppose that the molecule loses as mass 41 the group $-CH_2-CH=CH_2$. The next peak is a further mass 13 lighter in weight, and suggests removal of a further —CH. This is probably present as $-CH_2-$; not too much reliance is placed on the number of hydrogen atoms, since they can take part in re-arrangements

so easily. Assuming then, that the molecule contains the group $-CH_2-CH_2-CH=CH_2$, it can be seen that the next peak in the spectrum corresponds to loss of a further mass 16. This suggests an oxygen atom next in the chain. The next mass lost is 28, (i. e. two heavy atoms), and this, together with the very strong peak at mass 105, suggests this to be

$$\begin{matrix} & O & \\ & \| & \\ -CH_2-CH_2-CH=CH_2 & & \end{matrix}$$

due to loss of $-C-$ since compounds containing this group tend to break

$$\begin{matrix} & O & \\ & \| & \\ -CH_2-CH_2-CH=CH_2 & & \end{matrix}$$

at the $-C-$ bonds. This leaves a mass of 77, which is the phenyl group. The substance is thus ω-butenyl benzoate. This identification illustrates the type of information on molecular structure obtainable by mass spectrometry.

Mass spectrometry has a further advantage as an analytical method in the very wide range of peak heights which can be dealt with. Thus, calling the weakest peak which can be detected 1 unit strength, peaks of the order 10^5 units can be simultaneously examined. This means that very small amounts of impurity (down to a few p. p. m.) can often be measured and identified in an almost pure substance, provided that there is no serious overlapping of the mass spectra of the substance and its impurity. If the impurity is more volatile than the bulk of the material, then using the method of direct insertion without intervening leak, the sensitivity of the method can be made many times greater. Thus, in favourable cases, the mass spectrometer provides a method for the analysis of very small quantities of material present as impurities, without the need of prior isolation of these impurities. The method has been found particularly useful in the examination of polymer intermediates, where in many cases impurities cannot be detected by any chemical method, but where it is obvious that impurities must have been present due to the physical properties of the polymer produced. An example of the identification of a small amount of impurity in an almost pure compound is given in Fig. 9, which shows the spectrum of a sample of acetyl acetone (molecular weight 100), showing the presence of impurity peaks at masses 106, 105, 91 which were identified as due to xylene. This had been introduced during preparation of the acetyl acetone, when it had been dried with sodium which had been stored in xylene. Subsequent distillation had failed to remove the xylene, which has the same boiling point as acetyl acetone.

This paper has dealt only with the analysis of compounds boiling below about 400° C. Information on compounds less volatile than this can only be obtained indirectly. For example, one method is to pyrolyse the involatile material whose constitution is required at high temperature 'in vacuo' and to examine the products of pyrolysis. Although this method often

leads to useful information on groups present in the starting material, a complete analysis can seldom be achieved by its use.

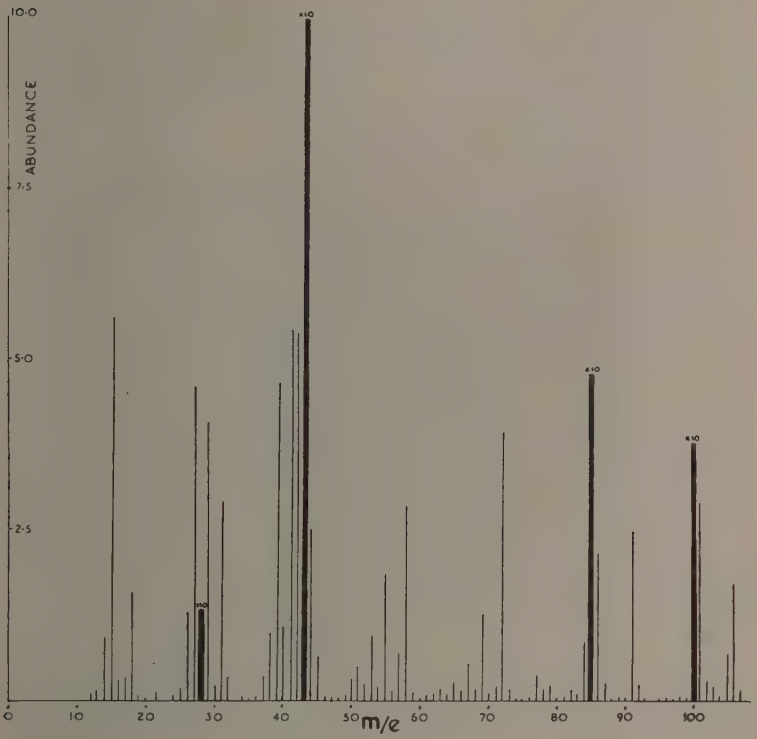


Fig. 9. Acetyl Acetone

Summary

The method of analysis of an organic compound by mass spectrometry consists in the bombardment of the vapour of the compound at a pressure of 10^{-5} to 10^{-6} mm Hg with electrons having energies of 50 to 100 volts. These energies are sufficient to break down the molecules in a variety of ways forming positive, negative and neutral fragments. A plot of the relative abundances of the various positive ion species against their mass to charge ratio is the mass spectrum, which provides a means of deducing the molecular structure of the bombarded substance.

The method is limited to substances of sufficient stability to give the above vapour pressures without decomposition, though less volatile sub-

stances can be examined after prior pyrolysis. It is a micro-method in that less than 1 mg of material is necessary for production of the spectrum, and often, very much less than this is needed to identify a compound.

The sample handling system is described in detail and mention is made of the usefulness of a vapour-phase chromatograph as a means of purification of samples before examination of their mass spectra, or in the examination of mixtures, where the mixture mass spectrum is too complex for complete analysis to be possible.

The mass spectrometer gives several unique advantages over other methods of chemical analysis in cases where samples are sufficiently volatile for their mass spectra to be obtained. Due to the low pressures employed in the ionization chamber, collisions between molecules or ions are very unlikely, and the heaviest ion which can be obtained (excluding those containing heavy isotopes) is that formed from a complete molecule by removal of an electron. This ion can usually be recognized, and its mass measured accurately. It is shown how this immediately limits the number of possible empirical formulae even if the accuracy of measurement is, say, only 1 in 10^3. However, mass measurements can easily be made to 1 in $2 \cdot 10^4$ which is sufficient to show up the nuclear packing energy differences for the elements, and often, a unique empirical formula can be written for the unknown compound from mass measurement alone. Further evidence on the empirical formula can also be obtained by measurements of the abundances of the naturally occurring isotopes. An illustration of the application of these methods is given.

So far, we have only considered the usefulness of the 'parent' ion of the mass spectrum, but to make use of the method for the determination of structure, full use must be made of the breakdown peaks in the spectrum whose compositions provide the information on the arrangement of the atoms within the molecule. Unfortunately, the mechanism of formation of the positive ions by electron bombardment is not understood, and for the elucidation of the molecular structure from the mass spectrum use is made of empirical rules based on a large number of published mass spectra which indicate correlations between structure and the breakdown pattern given by the mass spectra. An example of the use of these rules to identify an unknown compound is given.

A further advantage of mass spectrometry is that it is often possible to identify impurities and determine their concentration even in an almost pure substance without any previous concentration of the impurity. Due to the wide range of ion beam strengths with it is possible to deal in the mass spectrometer, impurities present to only a few parts per million can sometimes be identified and measured. An example of this type of analysis is given.

Zusammenfassung

Die Analyse einer organischen Verbindung durch Massenspektrometrie besteht in dem Beschuß der bei 10^{-5} bis 10^{-6} mm Hg verdampften Verbindung mit Elektronen von 50 bis 100 V Energieinhalt. Diese Energie ist hinreichend, um die Moleküle in verschiedener Art zu zerlegen, wobei positive, negative und neutrale Bruchstücke gebildet werden. Trägt man die relative Menge der verschiedenen positiven Ionenarten gegen das Verhältnis Masse zu Ladung auf, so erhält man das Massenspektrum, mit dessen Hilfe man auf die Struktur der beschossenen Substanz schließen kann.

Das Verfahren ist auf Substanzen beschränkt, die genügend stabil sind, um sich bei dem angeführten Dampfdruck nicht zu zersetzen, obgleich weniger flüchtige Substanzen nach vorhergehender Pyrolyse untersucht werden können. Es handelt sich um eine Mikromethode, da weniger als 1 mg Substanz für die Gewinnung des Spektrums nötig ist und oft noch viel weniger gebraucht wird, um eine Verbindung zu identifizieren.

Die Behandlung der Probe wird im Detail beschrieben und die Zweckmäßigkeit der Reinigung der Substanz durch Chromatographie der Dampf-Phase vor der massenspektographischen Untersuchung hervorgehoben, besonders wenn das Spektogramm einer Mischung zu komplex ist, um eine vollständige Analyse zu ermöglichen.

Das Massenspektrometer bietet einige besondere Vorteile gegenüber anderen Verfahren der chemischen Analyse von hinreichend flüchtigen Substanzen. Wegen des niederen Druckes in der Ionisationskammer sind Zusammenstöße zwischen Molekülen und Ionen sehr unwahrscheinlich. Das schwerste Ion, das man erhält (mit Ausnahme jener, die schwere Isotopen enthalten), entsteht aus einem kompletten Molekül durch Abspaltung eines Elektrons. Dieses Ion kann man gewöhnlich erkennen und seine Masse genau feststellen. Es wird gezeigt, wie dadurch die Anzahl möglicher empirischer Formeln eingeschränkt wird, selbst wenn die Genauigkeit der Messungen nur 1 auf 10^3 beträgt. Massenbestimmungen können aber leicht bis auf 1 auf $2 \cdot 10^4$ durchgeführt werden, was hinreicht, um die Unterschiede der Packungsenergien im Kern der Elemente aufzuzeigen. Oftmals kann man aus der Massenbestimmung allein die empirische Formel der unbekannten Verbindung aufschreiben. Weiterer Einblick in die empirische Formel ist aus der Bestimmung der Menge an natürlichen Isotopen zu gewinnen. Die Anwendung dieser Verfahren wird gezeigt.

So weit wurde die Bedeutung des „Primärions" des Massenspektrums in Betracht gezogen, aber für die Aufklärung der Struktur müssen auch die den einzelnen Bruchstücken entsprechenden Spitzen (Maxima) im Spektrum herangezogen werden, deren Stellung Aufklärung über die Anordnung der Atome im Molekül geben. Leider ist die Bildung positiver Ionen durch Elektronenbeschuß nicht geklärt, so daß man sich bei der Deutung der Molekülstruktur aus dem Massenspektrum an empirische Regeln zu halten hat, die aus einer großen Zahl veröffentlichter Massenspektren, an denen die Beziehungen zwischen der Struktur und dem Abbauschema, wie es das Massenspektrum zu erkennen gibt, zu entnehmen sind. Ein Beispiel für die Anwendung dieser Regeln auf die Identifizierung einer unbekannten Verbindung wird angeführt.

Ein weiterer Vorteil der Massenspektrographie besteht darin, daß oft die Möglichkeit zur Identifizierung von Verunreinigungen und deren Konzentrationsbestimmung auch in fast reinen Substanzen ohne vorherige Anreicherung dieser Verunreinigungen gegeben ist. Infolge der großen Länge der

Ionen-Linien, mit denen man es beim Massenspektrometer zu tun hat, können mitunter Verunreinigungen identifiziert und gemessen werden, die nur in einigen Teilen pro Million anwesend sind. Ein Beispiel einer solchen Analyse wird dargelegt.

Résumé

La méthode d'analyse d'un composé organique par spectrographie de masse consiste à bombarder la vapeur du corps à une pression de 10^{-5} à 10^{-6} mm de mercure, avec des électrons d'énergie comprise entre 50 et 100 volts. Ces énergie sont suffisantes pour briser les molécules de diverses façons en donnant des fragments neutres, positifs ou négatifs. Le graphique de l'abondance relative des diverses espèces d'ions en fonction du rapport masse-charge s'appelle le spectre de masse; il fournit un moyen de déterminer la structure moléculaire de la substance bombardée par les électrons.

Cette méthode est limitée aux substances de stabilité suffisante pour fournir une vapeur sans se décomposer; cependant les corps les moins volatils peuvent subir d'abord une décomposition sous l'action de la chaleur. C'est une microméthode puisque moins de 1 mg de substance suffit pour l'obtention du spectre; souvent beaucoup moins suffit à l'identification d'un composé.

On décrit en détail la méthode de manipulation de l'échantillon; on souligne l'utilité d'une chromatographie en phase vapeur pour la purification des échantillons avant l'obtention de leur spectre de masse, ou dans l'examen des mélanges, lorsque le spectre de masse du mélange est trop complexe pour que l'analyse complète en soit possible.

La spectrométrie de masse présente plusieurs avantages spécifiques sur les méthodes d'analyse chimique lorsque les échantillons sont suffisamment volatils pour qu'on puisse obtenir leur spectre de masse. En raison des très faibles pressions qui règnent dans la chambre d'ionisation les collisions entre molécules et ions sont très peu probables et l'on peut obtenir les ions les plus lourds possibles (indépendamment de ceux dus aux isotopes lourds) c'est-à-dire ceux qui sont formés à partir de la molécule entière par enlèvement d'un électron. Cet ion est facilement reconnaissable et sa masse mesurable avec précision. On montre comment ce fait limite immédiatement le nombre des formules empiriques possibles même si la précision des mesures est seulement $1‰$. Cependant, les mesures de masse peuvent être faites facilement à 1 ou $2 \cdot 10^{-4}$ près, ce qui est suffisant pour mettre en évidence les différences d'énergie de groupement des noyaux des éléments; souvent on peut écrire une formule empirique unique d'un composé inconnu, à partir d'une seule mesure de masse. Les mesures d'abondance des isotopes naturels présents peuvent fournir des renseignements sur la formule empirique. On donne un exemple d'application de ces méthodes.

Jusqu'ici nous avons considéré seulement l'utilité de l'ion «parent» du spectre de masse, mais dans l'emploi de cette méthode pour la détermination des structures, on doit utiliser les mesures des produits de rupture ce qui fournit des renseignements sur l'arrangement des atomes dans la molécule. Malheureusement, le mécanisme de formation des ions positive par bombardement électronique n'est pas connu e pour élucider les structures molèculaires à partir du spectre de masse, on emploie des règles empiriques déduites d'un grand nombre de spectres de masse connus; il existe des corrélations entre la structure et le schéma de rupture établi à partir du spectre de masse. On donne un exemple de l'emploi de ces règles pour l'identification d'un composé inconnu.

La spectrométrie de masse présente l'avantage qu'il est souvent possible d'identifier des impuretés et d'en déterminer leur concentration même dans une substance presque pure sans concentration préalable de l'impureté. En raison du large intervalle d'intensité du faisceau d'ions qu'il est possible de réaliser dans le spectromètre de masse, les impuretés présentes à raison de quelques parties par million peuvent être identifiées et mesurées. On donne un exemple de ce type d'analyse.

Laboratoire de recherches micro-analytiques 11, rue Pierre Curie
et
Laboratoire de recherches physiques, 1, rue Victor Cousin, Paris, 5 e

Interprétation des spectres d'absorption infrarouges de phosphites et d'hypophosphites métalliques

Par

Clément Duval et Jean Lecomte

(Reçu le 16 Juillet 1955)

Bien que commencé en 1951, ce travail n'a pas été publié afin de pouvoir l'étendre de la région 650—1600 cm^{-1} avec une dispersion suffisante aux régions 300—650 et 1800—3700 cm^{-1} tout en augmentant la précision dans la première région citée. Aussi, nos résultats ne font-ils pas double emploi avec ceux de *D. E. C. Corbridge* et *E. J. Lowe*[1] sur 92 sels d'acides oxygénés du phosphore (avec prisme de sel gemme). Notons aussi que nous avons pu abandonner leur méthode comparative d'interprétation pour reprendre la théorie générale des vibrations moléculaires, telle qu'elle avait déjà été donnée à propos des spectres Raman de ces substances, en particulier par *J. P. Mathieu* et *J. Jacques*[2].

Nous avons préparé à l'état de grande pureté 15 hypophosphites et 6 phosphites métalliques et les avons étudiés au moyen de trois spectromètres Perkin-Elmer (modèles 21, 112 et 12 C), équipés avec des prismes de chlorure de sodium, de bromure de césium et de fluorure de lithium, entre 300 et 3700 cm^{-1} environ, à l'état de poudre (sèche ou humectée de vaseline ou d'hexachlorobutadiène).

Nous trouvons généralement pour l'état de poudre, surtout entre 700 et 1200 cm^{-1}, un nombre de bandes notablement supérieur à celui des raies Raman, mesurées pour des solutions aqueuses. On peut en rechercher l'explication: 1° dans la présence possible d'impuretés, cette hypothèse étant à éliminer par suite de l'existence de dédoublements ou de détriplements analogues aux nôtres dans le travail de *Corbridge* et *Lowe*; 2° par le couplage des molécules dans la maille cristalline, cette interprétation classique ne pouvant toutefois jouer dans tous les cas, car on devrait trouver, en parcourant la série des sels métalliques, sensible-

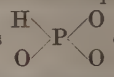
ment la même séparation entre les composantes, ce qui n'est sûrement pas le cas; 3° dans l'existence de plusieurs formes moléculaires où il faudra retenir uniquement celles qui ne contiennent ni le groupement OH ni une „double"liaison P = 0 (dont les maxima caractéristiques font défaut) et qui font apparaître les liaisons P — H se traduisant, respectivement pour les phosphites et les hypophosphites par une ou deux bandes fortes entre 2300 et 2400 cm^{-1}; cette hypothèse se montre en accord avec les déterminations magnétiques de *P. Pascal;* 4° pour les phosphites, un abaissement de la symétrie moléculaire, relativement aux hypothèses avancées par d'autres auteurs.

Hypophosphites

Un modèle moléculaire à 5 masses vibrantes comme , avec la symétrie C_{2v} possède, on le sait, neuf vibrations simples, distinctes, dont huit doivent être actives dans l'absorption et dans l'effet Raman. Pour la commodité de l'analyse, nous pouvons considérer à part les groupements PO_2 et PH_2 qui possèdent chacun deux vibrations de valence (symétrique ν, antisymétrique ν_3) et une vibration de déformation (ν_2). Pour PO_2, on retrouve bien des bandes fortes signalées par l'étude de la diffusion, dans les régions de 460 et 1050 cm^{-1} (ν_2 et ν_1). Pour ν_3, nous proposerions de choisir la région de 820 cm^{-1} (forte absorption et raie Raman faible, dépolarisée) plutôt que la zone de 920 cm^{-1} car, à la raie Raman intense et dépolarisée ne correspondrait qu'une absorption faible et souvent inexistante. Pour PH_2, les 2 maxima dans la région de 2300—2400 cm^{-1} s'identifient avec ν, et ν_3 alors que ν_2 se trouve, soit dans la région de 1080, soit dans celle de 1150 cm^{-1} (dans chacune s'observe une raie dépolarisée et, tout ce que l'on peut dire, c'est qu'il s'agit, dans les deux cas, d'une vibration où les atomes d'hydrogène vibrent en occasionnant une déformation de la molécule). Les trois modes de vibration restants représentent des mouvements de toute la molécule et l'on prévoit une vibration symétrique donnant une raie Raman polarisée et deux vibrations antisymétriques (raie Raman dépolarisée). La première a été placée par *Mathieu* et *Jacques* vers 590 cm^{-1} (solution) et elle correspond peut-être à notre bande d'absorption vers 610 cm^{-1} (poudre). Les deux dernières vibrations ont déjà été signalées (vers 920 cm^{-1}, très faiblement active en absorption et vers 1150 ou 1080 cm^{-1}).

Phosphites

La multiplication des bandes nous semble provenir surtout de l'existence d'une symétrie peu élevée (C_{2v}). La séparation entre les maxima observés paraît un peu trop importante pour cadrer avec l'hypothèse

du couplage. Elle conduirait à adopter une représentation dans laquelle deux seulement des atomes d'oxygène seraient équivalents  et à abandonner la symétrie C_{3v} (trois atomes d'oxygène équivalents) proposée par *Mathieu* et *Jacques*, qui cadrait bien avec leurs résultats. On aurait alors les schémas suivants (positions moyennes en cm^{-1} variant dans une large proportion avec le métal)

PO_4^{---} ..	420		560			939	1050 cm^{-1}		
	(double dégénérée)		(triple dégénérée)			(simple)	(triple dégénérée)		
PO_3H^{--} ..	460	500	560	575	1120	990	1030	1050	2300
$PO_2H_2^-$ ..	460	920	590	1080	1150	1150	820	2300	2400

En passant de PO_4 à PO_3H une liaison P — O devient une liaison P — H et de nouveau de PO_3H à PO_2H_2, une liaison P — O se trouve remplacée par une liaison P — H, impliquant des déplacements corrélatifs, mais une suite de bandes des phosphites vers 610 cm^{-1} resterait inexpliquée.

Un certain nombre de phosphites et d'hypophosphites possèdent de l'eau de cristallisation dont les bandes d'absorption correspondantes se placent dans la région 3170 à 3400 cm^{-1} environ avec des positions qui dépendent du degré de liaison de l'eau. Pour les sels anhydres, nous avons parfois mesuré des maxima dans la région de 3400 à 3500 cm^{-1}; il s'agit vraisemblablement d'eau adsorbée par les molécules au bout d'un temps variable après la préparation.

Résumé

L'étude de 15 hypophosphites et de 6 phosphites métalliques en poudre, entre 300 et 3700 cm^{-1} permet une interprétation des spectres infrarouges avec la considération des structures moléculaires et la comparaison avec les spectres Raman des solutions. Relativement à ce dernier point, les spectres infrarouges apparaissent beaucoup plus complexes.

Zusammenfassung

Die Untersuchung von 15 Metallhypophosphiten und 6 Metallphosphiten in Pulverform in dem Bereich zwischen 300 und 3700 cm^{-1} ermöglicht eine Interpretation der Infrarotspektren in Bezug auf ihre Molekülstruktur und deren Vergleich mit den Ramanspektren ihrer Lösungen. Dieser zeigt, daß die Infrarotspektren sehr viel komplexerer Natur sind.

Summary

The study of 15 hypophosphites and 6 metal phosphites in the form of powders, between 300 and 3700 cm^{-1}, allows an interpretation of the infra red spectra with consideration of the molecular structures and a comparison with the Raman spectra of the solutions. With respect to the latter point, the infra red spectra seem much more complex.

Discussion

M. *D. Monnier* (Genève): Est ce que vous avez recherché ces raies en fonction du p_H?

M. *C. Duval:* Vous savez la manière d'opérer sur des sujets si difficiles: il faut d'abord mettre de coté un certain nombre de difficultés. Alors, nous travaillons à l'état sec. Là le p_H n'intervient pas. Après, je vous ai dit, que chaque fois qu'un corps était, le spectre à l'état sec ou en solution anhydre aqueuse était toujours la même. C'est un très grand champ pour le développement de la méthode que vous est présentée. Maintenant, en ce qui concerne les hypophosphites, qui sont tous solubles la question du p_H dans l'eau ne compte pas beaucoup. Il faut faire attention, s'il s'agit de l'acidité propre de l'hydrolyse de ces sels ou s'il s'agit de l'acide que vous avez ajouté. N'oubliez pas, que le p_H changera tout, il faut mettre un acide dans de cas là. D'ailleurs je crois, que quelques hydrazydes le gènent nettement. Alors il est inutile de compliquer le problème en mettant de l'acide acétique ou sulfurique et surtout ce dernier, qui a même précisement une bande dans cette région. D'une manière générale cette question du p_H n'a pas encore été suivie en apparence. Mais enfin avec ce que nous avons dit avant-hièr, c'est à dire mesure de cinétique, puisque nous sommes des analystes-nés, paraît-il, il faut continuer dans cette voie; nous allons d'abord tirer tout ce qui est possible de la méthode. Mais je crois que cette question du p_H n'influence pas beaucoup l'état de ces bandes. Sauf naturellement s'il y a une hydrolyse complète dans des cas comme celui de sels ternaires qui cristallisent dans un autre système. La symétrie étant changée, le spectre infrarouge est complètement boulversé.

Bibliographie

[1] *D. E. C. Corbridge* et *E. J. Lowe*, J. Chem. Soc. London **493** (1954).
[2] *J. P. Mathieu* et *J. Jacques*, C. r. acad. sci., Paris **215**, 346 (1942).

Laboratoire de recherches micro-analytiques. 11, rue Pierre Curie, Paris, 5

Premières applications du thiocarbohydrazide en chimie minérale

Par

Clément Duval et **Tran Ba Loc**

(Reçu le 28 Octobre 1955)

Le thiocarbohydrazide que nous représentons provisoirement par la formule $S = C(NH—NH_2)_2$ a été préparé avec un rendement de 80% par la réaction de *Stollé* et *Bowles*[1] en condensant une molécule de sulfure de carbone avec deux molécules d'hydroxyde d'hydrazinium. C'est un solide incolore, devenant rose par exposition à une trop vive lumière, se décomposant nettement avant fusion, à 94° quand on le chauffe linéairement dans la thermobalance à raison de 150°/heure. Nous l'utilisons soit en solution aqueuse à 0,5% soit dans le mélange eau-éthanol pris dans le rapport volumétrique 3/1.

1° *Essais à la touche.* — Ces essais ont été effectués sur plaquette ou en microtube de centrifugeuse; ils ne réussissent pas, en général sur le papier à touche. Les cations correspondants aux métaux suivants ne donnent aucune réaction apparente: alcalins, alcalino-terreux, béryllium, magnésium, or, étain-II, tungstène, aluminium, chrome-II, chrome-III, niobium, tantale, scandium, yttrium, terres cériques y compris le cérium-III, gallium, indium, zirconium, hafnium, osmium, uranium-IV et sélénium-VI. *Steiger*[2] avait toutefois constaté avant nous que le ruthénium fournit une coloration rouge, tandis que l'osmium ne donne pas de réaction visible.

Par contre, les cations issus des métaux suivants donnent des précipités diversement teintés ou des colorations à grande dilution: platine-IV (chamois), palladium-II (crème), molybdène-VI (rose à marron), cérium-IV (blanc), thorium (blanc), nickel (rouge), cobalt (orangé), zinc (blanc), cadmium (blanc), fer-II (vert olive), fer-III (violet), cuivre-II (gris-vert foncé), plomb (jaune citron), bismuth (orangé), mercure-I et II (blanc), argent (jaune), thallium-I (jaunâtre), uranium-VI (rouge vif),

vanadium-IV (jaune), sélénium-IV (précipité de sélénium rouge), tellure-IV et VI (précipitation de tellure noir), chrome-VI (gris-bleu).

Les autres ions minéraux sont en cours d'étude.

Tout comme l'hydroxy-8 quinoléine, le thiocarbohydrazide présente un caractère amphotère qui lui permet de réagir avec divers anions comme les hétérocomplexes du molybdène et du tungstène. C'est un réducteur assez puissant.

Les précipités formés nous paraissent résulter d'une substitution sur l'un des groupements $—NH_2$; ils n'apparaissent généralement pas lorsqu'on substitue l'hydrogène de ces groupements, par exemple, par un groupement phényle; ainsi, le dérivé de formule $S = C(NH—NH—C_6H_5)_2$ ne donne aucune réaction avec le molybdène. Pour ces précipitations, nous avons déterminé les seuils de pH; le réactif se prête bien à la révélation des taches obtenues par chromatographie de partage sur papier. Il permet, par examen au microscope, de distinguer les chlorates, bromates, iodates, periodates. Mélangé avec du kaolin et utilisé en colonne adsorbante, il permet aisément de répéter quelques expériences d'*Erlenmeyer* faites avec l'oxine.

2° *Etude spéciale de la réaction avec le molybdène.* — A pH 2,0, il se forme un précipité marron avec les dérivés du molybdène hexavalent (paramolybdate d'ammonium) alors que les tungstates ne fournissent, pour aucune valeur du pH, de réaction colorée ou de précipitation. La sensibilité a pour valeur pD 4,6; elle n'est pas diminuée par la présence du tungstène. Le précipité marron formé se dissout très bien dans un mélange d'acétone et de *n*-butanol (rapport volumétrique 1/2); ce fait permet d'extraire en *une seule fois*, le molybdène mélangé au tungstène.

On sait aussi que le molybdène gêne considérablement le dosage colorimétrique de l'uranium par la méthode au thiocyanate. Or à pH 2,0 le précipité rouge signalé plus haut comme devant se former entre le thiocarbohydrazide et l'uranium-VI n'apparaît pas; la séparation molybdène-uranium est excellente à ce pH soit par filtration ou centrifugation du précipité de molybdène s'il est suffisamment abondant, soit par extraction sélective dans la micro-ampoule à décantation. La solution brune obtenue dans le mélange acétone-*n*-butanol est stable pendant plusieurs jours; elle suit la loi de *Beer* tout au moins pour la longueur d'onde 400 mμ où nous conseillons de faire la mesure et pour une teneur en molybdène supérieure à 15 μg/ml.

Les courbes de thermolyse enregistrées avec les divers produits de substitution du thiocarbohydrazide par les métaux présentent sensiblement la même forme: décroissance continuelle pendant que les liquides de lavage disparaissent et que la matière organique se détruit (sans aucun palier transitoire); on est donc conduit à peser l'oxyde résiduel,

C'est ce qui arrive pour le cas du molybdène, précipité à froid, à pH 2,0 avec un réactif aqueux à 1% ajusté au même pH. Le mûrissement du dépôt est instantané. La filtration peut donc s'effectuer sur creuset de verre garni de soie de verre (suivant la méthode de l'un de nous); après lavage du précipité avec l'eau chlorhydrique à 1%, on porte ce creuset à 500° et, après l'inscription du palier de poids constant, on effectue la pesée sous forme d'anhydride MoO_3. Pour des poids de molybdène compris entre 70 et 80 mg, en présence ou non de tungstène et d'uranium, l'écart reste pour six mesures, compris entre —1,3 et +0,2%.

Résumé

Les auteurs proposent l'emploi du thiocarbohydrazide en chimie minérale. Ils donnent une première liste d'ions réagissants. Ce réactif apparaît déjà intéressant pour le dosage gravimétrique ou colorimétrique du molybdène en présence de tungsténe et d'uranium.

Zusammenfassung

Die Anwendung von Thiocarbohydrazid in der anorganischen Chemie wird vorgeschlagen und eine Liste der mit dieser Verbindung reagierenden Ionen angeführt. Für die gravimetrische oder kolorimetrische Bestimmung von Molybdän in Gegenwart von Wolfram und Uran scheint das Reagens von Interesse zu sein.

Summary

The authors propose the use of thiocarbohydrazide in inorganic chemistry. They give a preliminary list of reacting ions. This reagent appears to have some interest for the gravimetric or colorimetric determination of molybdenum in the presence of tungsten and uranium.

Discussion

M. *D. Monnier* (Genève): Je veux vous demander encore une question à ce sujet: le dosage du chrome(III) en présence de chromate est très difficile, surtout quand il y a très peu de chrome(III) et beaucoup de chromate. La séparation est pénible; alors comme vous avez parlé du fait qu'on pouvait précipiter par votre réactif le chromate et peut-être l'extraire . . .

M. *C. Duval:* L'extraction n'a pas été effectuée. Chromate, dichromate et trichromate [c'est à dire le chrome(VI)] précipitent intégralement, tandis que chrome(II) et Cr(III) restent en solution. Je ne serais pas étonné d'ailleurs que le produit de précipitation contienne du Cr(III). Il y a une teinte gris-bleu qui rapelle tout à fait certaines hydroxydes de chrome. J'ai dit en effet, que le réactif était légèrement réducteur. Alors comme tous ces précipités sont des laques, ils ne paraissent bien cristallisés tout d'abord il est probable qu'ils s'agisse d'une laque formée avec du Cr(VI) et une partie à l'état trivalent. L'essentiel est que l'on puisse peser Cr_2O_3.

N. N.: Wird das Eisen gefällt, auch das Eisen(III)?

M. *C. Duval:* Nous avons essayé 67 ions et le fer sous les deux valences précipite.

M. *H. Reimers* (Graz): Haben Sie diese Arbeiten schon veröffentlicht?

M. *C. Duval:* Ce travail a donné lieu à une prise de date aux Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, séance du 7 mars 1955, pour la priorité. Les détails paraîtrent ailleurs. J'ai communiqué en commun avec M. *Dat Xuong* et M. *Tran Ba Loc* dans le Bulletin de la Société Chimique une petite note préliminaire sur l'emploi du thiocarbohydrazide en analyse minérale et c'est surtout dans celle qui va apparaître prochainement dans «Mikrochimica Acta» qui contiendra tout l'essentiel de la chimie minérale. Nous insistons surtout sur la séparation molybdène-tungstène que je trouve vraiment très importante pour l'analyse sidérurgique. Vous savez, qu'avec l'α-benzoine-oxime et le toluène-dithiol vous pouvez précipiter les deux. Mais ensuite, le dosage colorimétrique du tungstène en presence du molybdène est très difficile, surtout s'il vous reste, et c'est tousjours le cas, une petite trace de fer, qui donne un fond continu dans le spectro-colorimètre. Les aciers à coupe rapide contiennent beaucoup de fer, de molybdène et de tungstène. Très souvent il est difficile de les analyser d'une façon très correcte. Quand ils contiennent en plus du niobium et du tantale remarquez que le niobium et le tantale ne sont pas précipités par le réactif. Alors voilà donc les trois réactifs, qui pourraient être intéressants pour la suite.

M. *V. Schuller-Götzburg* (Wien): Haben Sie schon die Trennung und Bestimmung von Wolfram und Molybdän in Gegenwart von Aluminium versucht?

M. *C. Duval:* Non. Nous avons pris des mélanges synthétiques des molybdates et des tungstates et puis nous avons fait un essai sur un échantillon d'acier à coupe rapide. C'est un point que je vais noter, on alors faites-le, parce que je crois, que ce réactif sera aussi intéressant que l'oxine et que je n'arriverai pas à tout faire dans mon petit laboratoire.

M. *V. Schuller-Götzburg:* Es wäre doch sehr interessant, die Untersuchung auf das Aluminium auszudehnen.

M. *C. Duval:* Dans quels alliages?

M. *V. Schuller-Götzburg:* Es wäre besonders interessant für die industriellen Legierungen und für die Sintermetalle.

M. *C. Duval:* Nous n'avons pas fait d'expériences. Dans notre programme il n'a pas été englobé. Alors nous vous donnons volontiers la permission de le faire vous-même. Le réactif va être commercial. Il utilise du sulfure de carbone et de l'hydrazine par la méthode de *Stollé* et *Bowles* dans les Berichte que M. *Dat Xuong* a mise au point vraiment d'une façon quantitative. La réaction marche même trop bien, il faut la ralentir.

M. *V. Schuller-Götzburg:* Durch Kühlung?

M. *C. Duval:* Oui, en refroidissant, mais cette préparation n'est pas nécessaire puisque le réactif va être commercial. Il faut mieux avoir un produit fait par kg et ensuite le débiter en gros.

M. *V. Schuller-Götzburg:* Das ist besser vergleichbar, danke sehr.

Bibliographie

[1] *R. Stollé* et *P. E. Bowles*, Ber. dtsch. chem. Ges. **41**, 1099 (1908).
[2] *B. Steiger*, Mikrochem. **16**, 195 (1934/35).

[Institute of Microbiology and Hygiene, University of Montreal, Canada

An Automatic Device for Quantitative Estimate of Paper Electrophoresis and Radioelectrophoresis

By

J. Sternberg

With 7 Figures

(Received May 24, 1955)

The obvious advantages of paper electrophoresis in clinical laboratory techniques largely justify the wide approval this method has won. To date, paper electrophoresis techniques are adapted for routine determination of proteins, lipids, polysaccharids, enzymes, hormones, etc. It was only natural that the isotope technique should be combined with paper electrophoresis, as has been the case with paper chromatography. *Durrum*, one of the first workers in this field, mentions this possibility in 1950, in connection with the detection of thyroid hormones[1]. Later, in 1952, *Gross* and associates[2] localise the two circulating hormones, thyroxine and triiodotyronin, with the aid of the same procedure; in clinical work, *Deiss* and associates[3] determine the value of protein bound iodine by cutting the electrophoretic paper into 5 mm wide strips, and by assaying the radioactivity of the eluted compounds. Recently, *Kallee*[4] uses the same technique in localising the ^{131}I-labelled insulin in serum and tissues. Most of the papers use radioautography as a means of identification of the radioactive compound; but even though this method is the most accurate for radioactivity assay, the long delay in obtaining the answer is an obstacle in its application as a routine work, where a rapid answer is essential.

The direct quantitative estimate of paper electrophoresis by transmitted or reflected light has been thoroughly studied and several systems are now commercially available*, [5, 6]. Some of the devices are automatic or only partly automatic, the paper being manually scanned.

---

* Scanning device by Lange, Hamburg.

On the other hand, there are devices constructed for continuous scanning of radioactive paper chromatography or electrophoresis*, [7]. It must however be noted that neither of the systems permits a simultaneous determination of optical density as well as that of the radioactivity, and a double equipment is expensive.

At the Radioisotope Laboratory of the Institute of Microbiology and Hygiene of the University of Montreal, we are using since 1953 a device which enables the simultaneous assay of radioactivity as well as the photometric determination of paper electrophoresis in approximately 2 hours. The apparatus is an adaptation of the standard equipment found in any radioisotope laboratory, its central instrument being the recording milliammeter used for the graphic recording of any ratemeter. The above recording milliammeter has been attached to a synchronized device used alternately for photometric determination or for radioactivity assay.

Principle and Description

1. *Recording milliammeter*

As previously mentioned, the ammeter is of a standard type (Esterline Angus) with a maximum deflection for 1 mA and an inertia of 0.4 seconds between two deflections. The maximum of deflection covers a distance of 11.3 cm (4.5); thus, as little as 20 microamperes change in the intensity of the detected current will be easily recorded, the correspondent graphic deflection being approximately 2.5 mm. The recording instrument is of the swinging type, this being a slight disadvantage for a direct estimate of the curves, the shape of the recorded curves being at first sight somewhat distorted (Fig. 3). However, this difficulty has been overcome, as it will be seen later; it must also be noted that there are other ammeters with a direct linear transcription instead of the curved one.

2. *Scanning device*

The basic part of this device is a copper plate, 35 cm long, 5 cm wide and 0.5 cm thick (Fig. 1). A 2.5 cm wide slit is cut throughout the lenght of the plate; a rack is cut on the inferior side, of the same pitch as a pinion linked to the recording ammeter. The pitch of the pinion is critical with respect to the speed of the recording ammeter, synchronizing the movement of the plate to that of the latter, usually 7.5 cm per minute or per hour. The fast movement is used for the photoelectric scanning, the slow movement being used for radioactivity assay.

Below the longitudinal slit, a fluorescent light or a 6 V, 6 A battery light bulb gives the light source necessary for the photometric deter-

* Actigraph, constructed by Nuclear, Chicago, USA.

mination. A photocell (type 931-A RCA, amplification factor 1×10^6, maximum response at 4000 Å) is housed in a copper cylinder coated matte black on the interior surface, and with a lateral window matching the side window of the photocell (25 mm/5 mm). The width and the

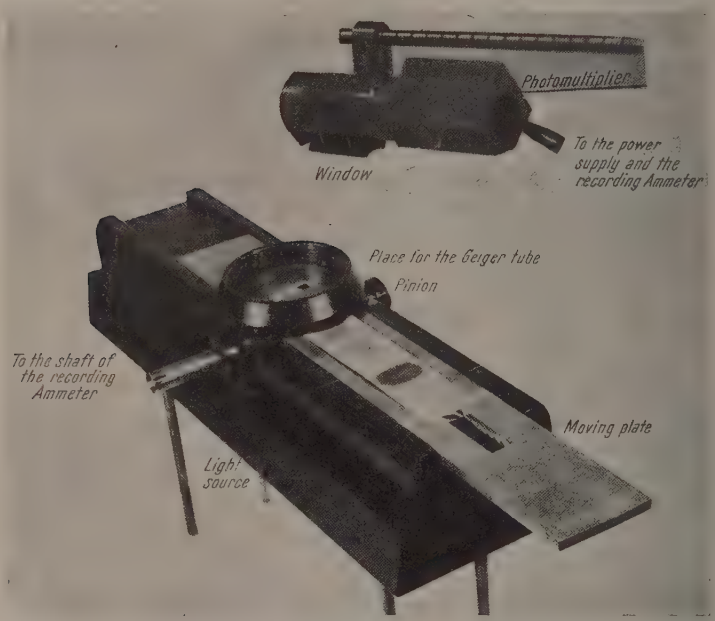


Fig. 1. Moving plate system and photocell attachment (represented separately, its place in 4 cm before the Geiger tube attachment). The light source is not visible, being in the wooden block

length of the aperture are regulated by a system of movable plates. A number of ordinary colored photographic filters will give the desired wavelength, when interposed between the light source and the moving plate. The photocell is connected to a high voltage supply, giving 700 to 1000 volts and 100 to 200 mA; a variable resistor regulates the voltage, the stability of the zero point of the photocell being secured by a second 25,000 ohms (5 watts) resistor placed between the output of the high tension and the photocell, or by a bridge circuit.

The intensity of the output current of the photocell is largely sufficient to be recorded directly, without any additional amplification. In white light, the maximum voltage required to give a full deflection of the recording ammeter (1 mA current) is 550 to 600 volts, with a 4 watts fluorescent light as a light source placed at 5 cm below the filter

paper. The voltage must be increased when scanning in monochromatic light, for instance 950 volts when a red filter is used.

A Geiger tube (Nuclear D-34) is also placed upon the center of the plate; the tube is shielded by a small lead shield and connected to the ratemeter (Nuclear type 1615 B) or a computer, when more accurate

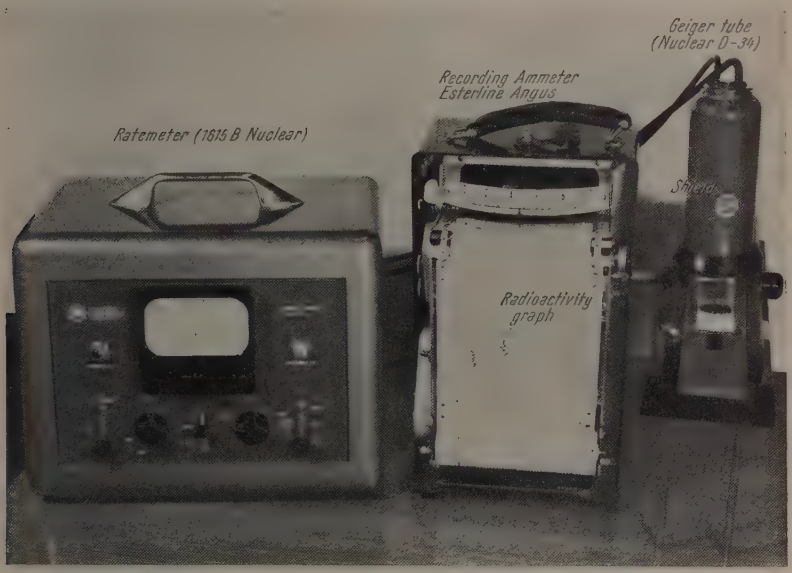


Fig. 2. Recording apparatus set for radiopherograms. The Geiger tube is in place, the photocell is removed and the axle of the moving plate is connected to the shaft of the Recording Ammeter. The curve is that of the activity of the paper electrophoresis assayed under the Geiger tube

counting is required (Berkeley 1600 or Tracerlab SC-18). The recording device set for radioactivity assay is shown in Fig. 2.

Technique of photometric determination

1. *Determination of the direct transmission graph*

The paper electrophoresis, usually run with 0.02 ml serum for 14 hours, is dried and stained as usual with an amidoblack solution in an acetic acid-ethyl alcohol mixture, for 15 minutes. It has often been published that amidoblack is more suitable for direct photometry than bromophenol blue, a fact which we ourselves have verified many times. Care must be taken to remove the excess of dyestuff fixed on paper, which can be done easily by washing the papers with a mixture of methyl alcohol 20%, acetic acid 8 to 10%, and water at 85° to 90° C for 10 minutes, at least

3 to 4 times. However, a faint bluish background remains on the paper, especially between the starting point and the first separated fraction (γ globulin); this is probably due to a certain irreversible absorption of protein in the filter paper, and also by a passive "trailing" of the neutral lipids, which can modify the transmission of the light. Therefore, in order to avoid a discrepancy between the zero points at the start and at the end, it is advisable to start the scanning before the albuminic fraction; otherwise, the values of the γ globulins are always higher than their real values.

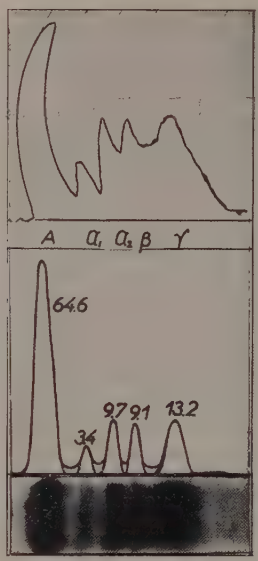


Fig. 3. Direct transmission and antilogarithmic conversion with subsequent planimetry

The papers are dried carefully, then rendered transparent with paraffin oil or any other similar product (anisol, bromonaphthalin, synthetic immersion oil, etc.). The transparent paper is put between two glass plates over the copper plate, so that the slit must cover the major part of the stained spots; the excess of oil must be removed, otherwise the transmission will be too high, due to an excess of reflected light through the oil droplets. The zero point is set and the recording ammeter is started; the geared plate moves synchronously with the recording ammeter and the curve of intensity proportional to the transmittance is recorded in 1 to 2 minutes, according to the length of the developed electrophoretic spectrum. The direct transcribed graph appears as shown in Fig. 3.

2. *Conversion of the direct graph*

It can be seen that the transmission graph differs from the well known electrophoretic pattern in two points: a) it is curved, due to the swinging type of recording, and b) it represents the *transmission* of light, which is the logarithm of the optical density, this latter being directly proportional to the amount of stained proteins. Therefore, in order to have an interpretable graph it will be necessary to reconvert the curve

into rectangular coordinates and antilogarithmic values. This can be done by three procedures, as follows:

I — *mathematical procedure*

The graph is divided into equal points, at approximately 2.5 mm distance; care must be taken that the inflexion points of the curves (minimum and maximum) should enter the scanned points. The antilogarithmic values are taken and the curve is reconstructed on a normal squared paper (10 divisions per inch or per 25 mm). Thus the curve is automatically redressed and its appearance is similar to a normal *Tiselius* curve (Fig. 3).

This procedure, if the most accurate, has the disadvantage of being very time consuming and it has been reserved only for reference experiments.

II — *electronic procedure*

It would be more convenient to have an electronic device which would follow the direct transmission current from the output of the photocell and extract the logarithms before they are recorded by the ammeter; thus the graphic instrument would record the antilogarithmic

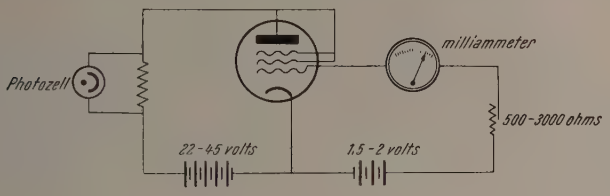


Fig. 4

values directly, and only a rectangular conversion would be necessary. *Snowden* and *Page*[8] published a paper describing an electronic circuit capable to extract antilogarithmic values; the schema of the circuit is presented in Fig. 4.

We have tried the above circuit, but unfortunately two major drawbacks prevented from its use in the scanning device: the output current is too low, therefore a further amplification stage is required, and 2) the resulting values are linear only for intensities higher than 0.2 to 0.3 milliamperes; below that level, a certain distortion is noted. As the γ, β, α_2, and α_1 globulins are scanned usually in this range of intensities, the circuit in its present state is not completely reliable; however, we are in process of studying the above possibility and further results will be presented later.

It must be remembered that, even if an electronic device will reconvert the logarithmic values, the direct traced graph will be curved, and a further transcription into rectangular coordinates will be necessary.

III — *mechanical procedure*

The easiest approach to the double problem of rapid reconversion into rectangular and antilogarithmic coordinates seems to be the me-

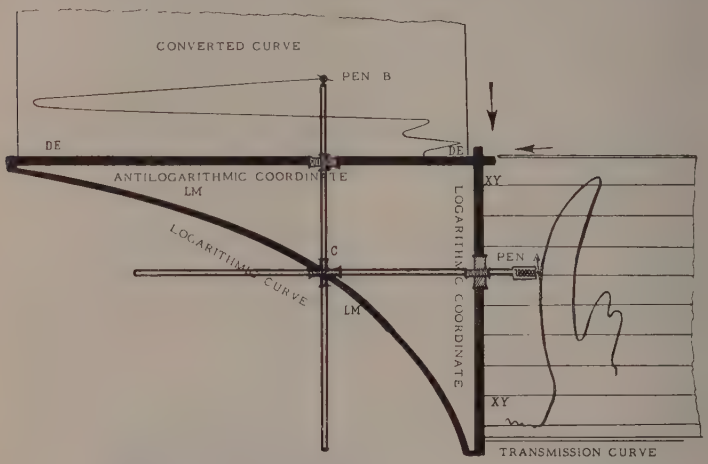


Fig. 5. Mechanical device for reconversion into antilogarithmic and rectilinear values

chanical one. We have tried several devices, the most convenient being that presented in the Fig. 5:

The apparatus consists of a mechanical coordinate system of metallic rods (*XY* and *DE*); the logarithmic values at *A* are converted into antilogarithmic values at *B*. All what must be done is to follow the transmission graph with the pen *A* and the antilogarithmic values of the above graph are simultaneously recorded at the pen *B*. The focal point of the conversion is at *C*; at this point, the two coordinate rods *XY* and *DE* are crossing and are linked to the curved rod *LM*. This is a rod which is bent in a shape of a logarithmic curve corresponding approximately to the equation $y = 1/\log x$. It should be noted that the system of coordinates from which the above curve was constructed is identical to that of the graph paper of the recording ammeter, i. e. the ordinate is curved instead of being rectilinear. Thus the converted values give directly the rectilinear values as well as the antilogarithmic ones.

The three rods, *XY*, *DE* and *LM* are linked by a collet consisting of three tubes which ride on the rods. The friction encountered may be

minimized by the use of a ball bearing system, but this is the most serious disadvantage of the device. Two drums hold the two graph papers, the transmission graphs and the reconverted graph; they are moving synchronously and are linked to the shaft of the recording milliammeter. Two gears set on a perpendicular axis, secure this synchronisation and the graph is reconverted with the same speed as that of the initial recording. The logarithmic pen is provided with a spring, in order to permit to follow the retrograd variations of the curve due to the initial curved recording.

The antilogarithmic pen transcribes directly the redressed curve, as seen in the figure.

The resulting surfaces are then planimetered and calculated with the usual planimeters (Ott, Keuffel & Esser, etc.).

Another variation of the system might be a direct transcription done directly by the recording ammeter. This can be done with the aid of a cam fixed in the swinging of the recording system. The profile of the cam must be calculated so that the transcribing system will give directly the antilogarithmic values. However, the procedure has many mechanical difficulties, the most important being the small strength of the swinging system as well as the errors to the inertia of this system.

Technique of Radiopherogram determination

The adaptation of the scanning device for radioactivity assay is rapidly done by placing a Geiger counter on the position indicated in Fig. 1. The Geiger tube is maintained in place by a lead shield, 2 cm thick. In Fig. 2, showing the complete set-up, the shield contains a preamplifying system, connected through a cathode follower to the ratemeter 1615 B and therefrom to the recording milliammeter.

Several remarks must be made regarding the direct measurement of radioactivity: 1) The minimum amount of activity scanned by this method is far higher than that obtained by direct count on radioactive solutions extracted from paper strips, as in the paper of *Deiss* and associates. Moreover, it is liable to important causes of error, when using soft beta emitters; the best results are obtained with gamma emitters (^{131}I, Fig. 6) or hard beta isotopes, such as ^{32}P (Fig. 7). Care must be taken to put always the paper with the face more intensely stained, otherwise the self absorption will be important even with hard beta emitters sometimes exceeding 40%. A good precaution consists in taking the same amount of serum—0.02 ml—, to absorb it on another filter paper, then to measure the activity of both faces of the paper in a regular counting system; thus, the error due to self absorption can be calculated.

2) As the amount of serum necessary for a good separation and photometric determination of proteins does not exceed 0.02 ml, another limiting factor arises here, namely the minimum of activity contained in a ml serum

which will give measurable results. The lowest range of the ratemeter is 500 counts/minute for a full deflection, translated by a deflection in the recording ammeter of 11.5 cm. Then the minimum of activity capable to be recorded by the system will be 40 counts/minute for 10 mm deflection (approximately the background of the shielded Geiger counter). This

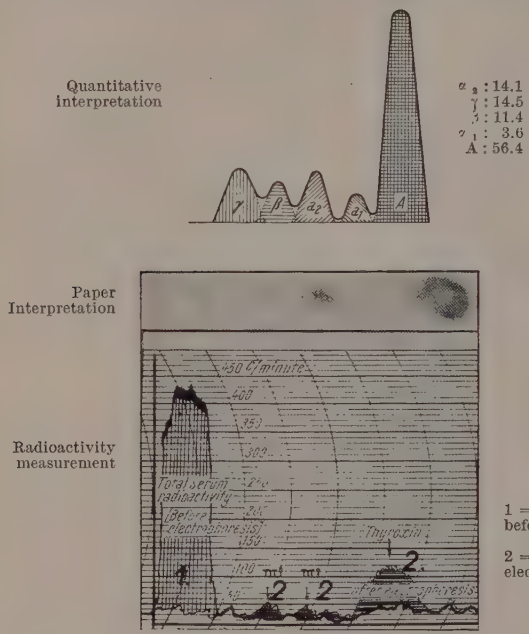


Fig. 6. Radiopherogram and photometric determination of serum proteins after administration of mineral ^{131}I. The area 1 represents the activity of an identical amount of radioactive serum before the electrophoretic separation, while the areas 2 are measured after the migration. The ratio of protein bound iodine can be calculated by dividing 1 by 2

amount of activity corresponds to a total activity per ml serum of

$$40 \cdot 50 = 2{,}000 \text{ counts/minute}$$

providing that all the radioactivity is concentrated in a single spot scanned by the Geiger tube. This is not the case for thyroxin and triiodotyronin determination, and a factor not lower than 5 to 6 must be applied in this case. One sees that the required minimum radioactivity is high enough, 10.000 to 12.000 counts in the case of iodine compounds; but one must consider that the ratemeter is a device with a low sensitivity. If the ratemeter is replaced with a scaler provided with a decimal counting unit and a computer, and the Geiger tube is replaced by a scintillation counter, the

accuracy of the device can be greatly improved. With our new device, using a SC-18 Tracerlab scaler and a scintillation counter, the sensitivity seems to be improved by a factor near 50 times the former value.

3) The recorded surface will be directly proportional to the real activity, therefore no reconversion procedure is necessary. However, the device must be calibrated for each isotope, by using a reference curve, obtained as follows: Increasingly amounts of isotope are deposed upon filter paper used for electrophoresis, which have been previously moistened with buffer and dried. Lately, we used non radioactive papers with an already developed electrophoretic spectrum, and we applied the radioactive solutions on the proteic spots, taking care not to exceed the proteic zones with the radioactive solutions. The radioactive spots are scanned and the resulting surfaces are integrated. The curve is constructed by plotting the total area of the radioactive spot as ordinate against the activity on the absciss. Naturally, the resulting areas must be carefully planimetered, with the same procedure as that for the photometric estimation.

4) It must also be remembered that the measurement of radioactivity is a statistical procedure, and a rapid scanning will give considerable errors; thus, the recording ammeter must be switched to the "hour feeding", and will scan with the speed of 7.5 cm per hour.

By respecting the above mentioned rules, it is possible to make accurate determinations, as is possible to see in the Fig. 6 and 7.

Fig. 6 shows a simple method to calculate the protein bound iodine simultaneously to the estimate of the respective fractions of thyroxine and triiodotyronin (TIT). Assuming that the thyroxine is migrating with or near the α_1 globulin, the activity of the above spot will be probably due to thyroxine, whereas the activity of the other globulinic spots will be probably due to TIT. A first assay prior to the electrophoretic migration will give the total serum activity; a second assay must be done simultaneously to a control consisting of a non radioactive serum run with an identical amount of mineral radioiodine, in order to determine the migration speed of mineral iodine. If the mineral iodine is well separated from the organically bound iodine,—which occurs almost constantly,—then the ratio of the proteic bound surface/total radioactive surface will be directly proportional to the ratio PBI/Total Iodine.

Fig. 7 shows the radiopherogram of a serum of lactating rabbit previously injected with mineral ^{32}P. The localization of the radioactive spot after the electrophoretic migration clearly shows that the mineral phosphorus injected did not migrate with any of the proteic fractions, but its electrophoretic migration was much greater than that of albumin. Another paper run simultaneously only with non radioactive serum and mineral radiophosphate has shown that the migration speed of the mineral

radiophosphate was identical to that of the examined paper. The conclusion is obvious, the radioactive phosphorus being carried only as mineral salt and not connected to the lipoproteins migrating with the β or α_1 globulins, as one might have expected[9].

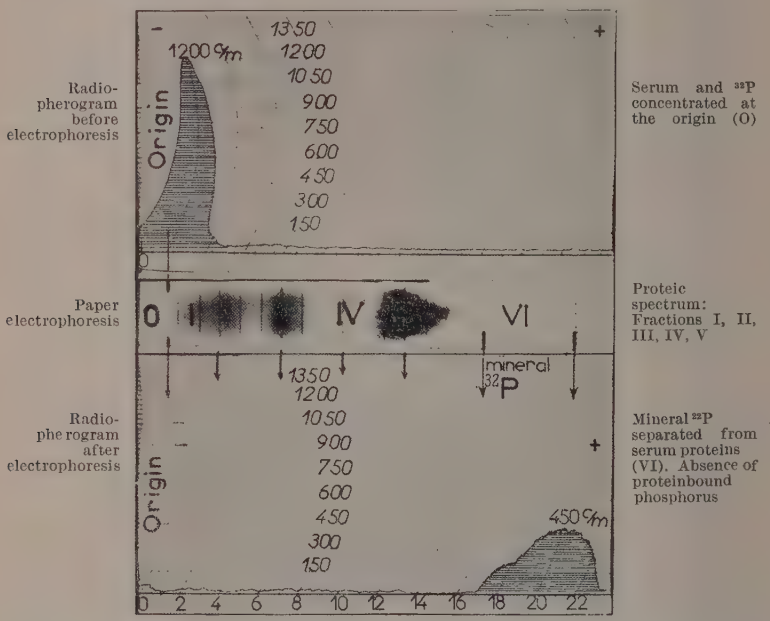


Fig. 7. Radiopherogram of serum proteins of lactating rabbit injected with mineral ^{32}P. The radioactive area of the inferior figure shows that the isotope did not migrate with any of the separated proteic fractions

Similar procedures might be used for the estimate of protein bound zinc, when using ^{65}Zn, a hard gamma emitter. The protein bound zinc seems to travel with the β globulins. Unfortunately, the danger of the diagnostic use of radiocalcium makes difficult to use the same procedure for the determination of protein bound calcium. Besides, ^{45}Ca is a soft beta emitter, the self absorption being too considerable to permit a reliable result. Perhaps the replacement of ^{45}Ca with ^{90}Sr, as it has been done in some biological experiments, could give a better approach to the problem. At any rate, the experiment must be made in vitro, ^{90}Sr being also a bone seeker like calcium and inadequate for human use.

Another possibility must be mentioned, that of the calculation of the half life of radioiodinated labelled human serum albumin, currently used for plasma volume determinations. The radiopherogram combined with the

electrophoretic determination could indicate easily the breakdown of the label from the albumin and its integration in the iodine metabolic circuit; a radioactive spot concentrated only in the albuminic region will indicate that the labelled albumin has not been broken down, while other secondary radioactive spots in the α_1 region will suggest an elaboration of radioactive thyroxin from the mineral iodine, released after the breakdown of albumin.

Summary

A device is presented for a simultaneous photometric scanning of paper electrophoresis and determination of radioactivity of the proteic spots. The stained papers are scanned by a photomultiplier and the curve transmitted light is directly recorded, then reconverted into an optical density curve. A rapid radioactivity scanning permits the determination of the total activity as well as the localization of the radioactive fractions in respect to their linkage to the serum proteins.

Zusammenfassung

Eine Vorrichtung zur gleichzeitigen photometrischen Auswertung von papierelektrophoretisch getrennten Eiweißlösungen und zur Bestimmung von deren Radioaktivität wurde beschrieben. Die auf dem Papier verteilten Flecken werden mit Hilfe eines Photomultipliers ausgewertet, die Kurve der Lichtdurchlässigkeit unmittelbar aufgezeichnet und sodann in eine Kurve der optischen Dichte umgewandelt. Eine rasche Auswertung der Radioaktivität ermöglicht sowohl die Bestimmung der Gesamtaktivität wie auch die Zuordnung der Aktivitätsanteile hinsichtlich ihrer Bindung an die verschiedenen Serumproteine.

Résumé

Description d'un dispositif permettant d'effectuer simultanément l'exploration photométrique d'une électrophorèse sur papier et la détermination de la radioactivité des taches protéiniques. Les papiers sont explorés après usage à l'aide d'un photomultiplicateur; la courbe de l'intensité de la lumière transmise est directement enregistrée puis reconvertie en courbe de densité optique. Une exploration rapide de la radioactivité permet de déterminer l'activité totale ainsi que la localisation des fractions radioactives relativement à leurs liaisons avec les protéines du sérum.

References

[1] *E. L. Durrum*, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2943 (1950).

[2] *A. H. Gordon, J. Gross, D. O'Connor*, and *R. Pitt-Rivers*, Nature **169**, 19 (1952).

[3] *F. Larson, W. P. Deiss*, and *E. C. Albright*, Science **115**, 626 (1952).

[4] *E. Kallee* and *G. Seybold*, Z. Naturforsch. **9**, 307 (1954).

[5] *A. L. Latner* and *C. C. Ungley*, Brit. Med. J. **1953** I, 467, 498.

[6] *E. M. Crook, H. Harris, F. Gassan*, and *F. L. Warren*, Biochemic. J. **56**, 434 (1954).

[7] *C. H. Williams* and *R. E. Smith*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **77**, 169 (1951).

[8] *T. Snowden* and *H. W. Page*, Rev. Sci. Instruments **21**, 179 (1950).

[9] *J. Sternberg*, Rev. Canad. Biol. **13**, 309 (1954).

Aus dem Max-Planck-Institut für Eisenforschung, Düsseldorf

Beiträge zur Mikromethodik in der Eisenforschung

Von

H. Malissa

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 11. Oktober 1955)

Die Bedeutung, die die Mikromethoden im weitesten Sinne des Wortes in den letzten 10 bis 15 Jahren erlangen konnten, geht nicht nur aus der Literatur[1], sondern auch aus der Tatsache hervor, daß die großen Werke und Forschungsanstalten der eisenschaffenden und eisenverarbeitenden Industrien eigene mikrochemische Arbeitsstätten errichtet haben. Wie groß allein im Max-Planck-Institut für Eisenforschung der Bedarf an Mikroanalysen ist, sei an Hand einiger Zahlen, Tabelle 1, beleuchtet.

Tabelle 1.

Jahr	Anzahl	Probenmenge in mg					
		< 1	1—2	2—5	5—10	10—20	> 20
		%	%	%	%	%	%
1953 ...	883	3	7	20	32	30	8
1954 ...	1315	7	10	32	34	12	5
1955 ... bis 1. 7.	728	9	10	25	30	15	11

Lag der Schwerpunkt der zur Untersuchung gelangenden Probemengen im Jahre 1953 noch zwischen 2 und 20 mg (82%) und der Anteil der Probenmengen von < 1 bis 2 mg bei 10%, so verlagerten sich diese im vergangenen Jahr schon sehr deutlich zu den kleineren Mengen (< 1 bis 2 mg: 17%) und im laufenden Jahr ist die Verlagerung zu kleineren Probenmengen noch stärker ausgeprägt. Daraus ist zu entnehmen, daß der Bedarf an Mikrogramm-Methoden immer größer wird und daß die analytische Forschung besonders in dieser Richtung vorangetrieben

werden muß. Bei den angeführten Zahlen handelt es sich immer um Materialmengen, die von anderen Stellen angeliefert wurden und nicht von Entwicklungsarbeiten des Mikrolaboratoriums. Auch sind die spektralanalytisch durchgeführten Untersuchungen darin nicht enthalten.

Die physikalischen Eigenschaften der Stähle und damit ihre Güte und Brauchbarkeit sind keineswegs nur aus ihrer chemischen Zusammensetzung abzulesen oder herzuleiten. Sie sind von ihrem Gefügezustand abhängig und dieser wiederum von der Wärmebehandlung des Stahles. Die metallographischen Untersuchungen mit ihren Ätz- und Abdruckverfahren zeigen an Metallschliffen wohl die Verteilung und Anordnung der verschiedenen Phasen, geben aber nur in vereinzelten Fällen über die chemische Zusammensetzung einzelner Gefügebestandteile genaue Auskunft. So unterscheidet sich z. B., wie an den Schliffbildern von Abb. 1, obere Reihe, gezeigt ist, metallographisch ein Eisencarbid (Fe_3C) nicht grundsätzlich von einem chromsubstituierten Eisencarbid $(Fe, Cr)_3C$ und dieses wiederum nicht von einem eisensubstituierten Chromcarbid $(Cr, Fe)_7C_3$. Auch übermikroskopisch kann in diesem Fall, siehe Abb. 1, untere Reihe, keine entscheidende Aussage gemacht werden, obwohl es sich im ersten Fall vorwiegend um das rhombische Eisenkarbid und im zweiten Fall um das hexagonale Chromkarbid handelt.

Zur Ermittlung der Zusammensetzung der verschiedenen Phasen im Stahlgefüge ist es erforderlich, diese Gefügebestandteile in untersuchbaren Mengen freizulegen. Dies geschieht mit Hilfe der Isolierungsverfahren, wie sie auch in dieser Zeitschrift schon kurz beschrieben wurden[1]. Dieses, von *P. Klinger* und *W. Koch* entwickelte Verfahren konnte nicht nur zur Freilegung der Gefügebestandteile in Stählen herangezogen werden, sondern auch zur Untersuchung von Guß- und Roheisen sowie für Sonderaufgaben, wie z. B. zur Isolierung intermetallischer Verbindungen aus Zinklegierungen[2]. Bei der elektrolytischen Isolierung wird das Material (der Stahl usw.) unter Bedingungen chemisch gelöst, bei denen bestimmte Bestandteile ungelöst im Rückstand, dem Isolat, verbleiben (siehe Abb. 6 der Mitteilung von *W. Koch*[1]). Will man ein vollständiges Bild über den Aufbau eines Werkstoffes erhalten, so ist anzustreben, daß nur das Grundmetall, also je nachdem, ob es sich um einen ferritischen oder austenitischen Stahl usw. handelt, der Ferrit bzw. Austenit, gelöst wird und daß alle anderen Gefügebestandteile, wie Carbide, Oxyde, Nitride und intermetallische Verbindungen ungelöst im Rückstand verbleiben. Im mikrochemischen Sinne stellt die Isolierung die Probenahme dar. Da aus elektrochemischen Gründen — will man Zersetzungen vermeiden — die Elektrolyse nicht beliebig lange durchgeführt werden kann, um so vielleicht größere Mengen von Gefügebestandteilen zu erhalten, hat man immer damit zu rechnen, daß nur 0,5 bis 2 g Stahl bzw. Metall aufgelöst werden dürfen und entsprechend geringe Mengen an Isolat erhalten werden.

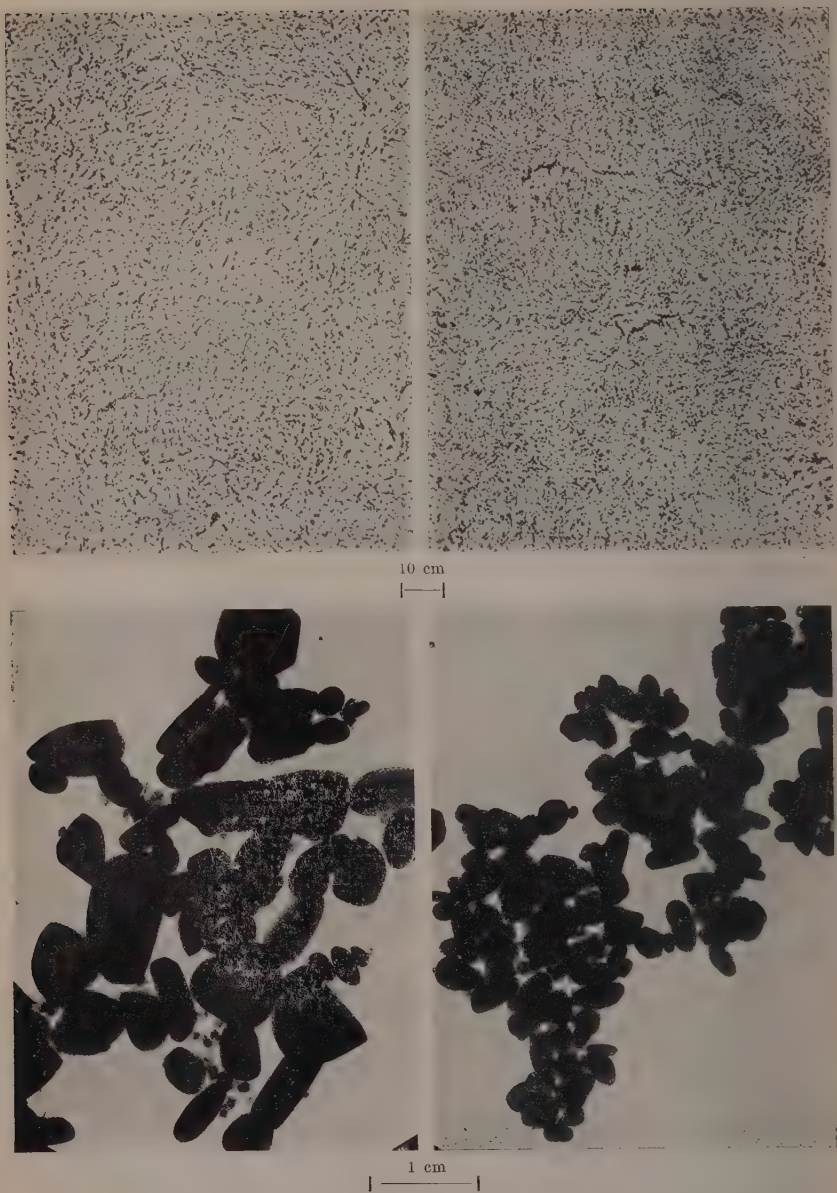


Abb. 1. Schliffbilder (obere Reihe) und elektronenoptische Bilder der isolierten Carbide (untere Reihe) von Stählen mit 0,87% Cr (linke Reihe) und 2,97% Cr (rechte Reihe)

Bei den Carbiden und beim Graphit erhält man im Mittel Mengen zwischen 2 und 10 mg, bei den Oxyden und Sulfiden erhält man selbst bei Auflösung von 10 g Stahl nur 0,5 bis 2 mg. Die Menge der Nitride ist im allgemeinen noch geringer. Von allen diesen Bestandteilen interessieren nun neben der chemischen Zusammensetzung auch die Struktur und die besonderen Wachstumsformen. Dementsprechend müssen von dem gewonnenen Isolat noch kleine Mengen für mikroskopische, übermikroskopische und Röntgenstrukturuntersuchungen abgezweigt werden. Nur die dann verbleibende Menge steht für eine mikrochemische Analyse zur Verfügung. Bevor diese aber in Angriff genommen wird, versuchen wir stets, die einzelnen Fraktionen in möglichst reiner und konzentrierter Form zu erhalten. Dazu dienen, wie bereits mitgeteilt[1], verschiedene physikalische Methoden. Da die freigelegten Isolatmengen teilweise noch am Probestück haften, werden sie durch eine Ultraschallbehandlung, die bei einer Frequenz von 20 kHz in 1 bis 20 Minuten durchgeführt wird, abgetrennt. Die so erhaltenen Gefügebestandteile bestehen aber noch aus einem Gemenge und müssen weiter getrennt werden. Es gelang *W. Koch* und *J. Bruch*[3], Graphit von den Carbiden mit Hilfe von Ultraschall und spezifisch schweren Lösungen (Tetrabromäthan + 0,5% Cyclohexen) abzutrennen, da der Graphit eine Dichte von 2,4 besitzt, während alle anderen Gefügebestandteile wesentlich schwerer sind (Eisencarbid z. B. 7,68). Nur Kieselsäure, die als Oxydeinschluß auftreten kann, besitzt eine Dichte, die der des Graphits gleichkommt. Wegen der oft innigen Verwachsung ist es oftmals schwierig, aus Guß- und Roheisen Graphit in reiner Form vom Carbid abzuscheiden. Diese Verwachsungen konnten jedoch durch eine 15 bis 30 Minuten dauernde Ultraschallbehandlung des im vorher genannten Dichtemittel suspendierten Isolates und nachfolgendes Zentrifugieren aufgehoben werden. Am Beispiel eines Hämatitroheisens sei der Wert dieses Verfahrens — Ultraschall- und Dichtetrennung gezeigt (Tabelle 2).

Tabelle 2.

Dichte	ohne Ultraschallbehandlung %	mit Ultraschallbehandlung %
2,40	4	20
2,40 – 2,70	10	3
2,70 – 2,96	20	1
> 2,96	66	76

Es gelingt weiter, die ferromagnetischen Bestandteile aus dem Gemenge durch eine nasse Magnetscheidung, wie dies in Abb. 10 der Arbeit von *W. Koch*[1] dargestellt ist, und die oxydischen Bestandteile durch die Chlorvakuumbehandlung, Abb. 8 der vorgenannten Arbeit, abzutrennen. Mit Hilfe der Mikromanipulation, Abb. 15 und 16a bis c des *Koch*schen Berichtes, können größere Einschlüsse abgesondert und getrennt untersucht werden.

Bei der elektrolytischen Isolierung bekommen wir einerseits das feste

Isolat und die Elektrolytlösung. Um nun den Weg der einzelnen Legierungselemente möglichst genau verfolgen zu können, ist es notwendig, sowohl die eine als auch die andere Fraktion zu analysieren. Allerdings hat man damit zu rechnen, daß bis zu 99% der gelösten Elemente Eisen sind, daneben aber auch andere wichtige und interessante Elemente, wie z. B. Mangan, Chrom, Nickel, Titan und Phosphor in der Größenordnung von 2 bis maximal 400 μg/ml. Zur Analyse werden aus dem den aufgefangenen Citratelektrolyten enthaltenden Kölbchen mit Hilfe einer trockenen Nullpunktspipette, Abb. 2, entsprechende Volumenanteile abgenommen und zur Zerstörung des Citrates und zur Vertreibung von Brom und Jod mit Schwefelsäure und Wasserstoffperoxyd im Mikrokjeldahl-Kölbchen behandelt. Die Zugabe von Wasserstoffperoxyd und das Kochen des Citratelektrolyten, also die nasse Veraschung, wird solange durchgeführt, bis eine klare Lösung erhalten wird. Danach wird die Lösung in ein 25-ml-Maßkölbchen übergeführt, woraus dann für die einzelnen Elemente die aliquoten Mengen entnommen werden[4].

Abb. 2. Nullpunktspipetten. V. l. n. r. für: 0,1; 0,2; 0,5; 1,2 und 5 ml

Ein Trennungsgang zur Analyse der Carbide ist in Tabelle 3 dargestellt. Bei der Analyse der Carbide stehen meist nur Mengen von 5 mg zur Verfügung. Diese werden, falls keine flüchtigen Oxyde zu erwarten sind, in dem in Abb. 3 gezeigten Mikroofen bis zur Gewichtskonstanz

Tabelle 3

Carbide

Einwaage: 1—5 mg

Cr, Mo, V, W, Fe, Mn, Ti, Cu, Co, Ni

↓

Glühen (wenn kein Mo)

↓

Aufschluß mit Na_2O_2

Lösen in H_2O

Lösung
Cr, Mo, V, W, (Ti)
einengen, Na_2TiO_3 abfiltrieren
Filtrat auf 25 ml
Cr photometr.
5 ml für Mo; photometr. als Mo $(CNS)_5$
5 ml für W; photometr. als WCNS
10 ml für V; photometr. mit H_2O_2

Niederschlag
Fe, Mn, Ti, Cu, Co, Ni
in HCl
Br_2-NH_4OH-Trennung

Niederschlag Fe, Mn, Ti
in HCl, auf 25 ml
5 — 10 ml für Fe, maßanal. mit $Ce(SO_4)_2$ oder photometr. mit Thioglykolsre
5 ml für Mn, photometr. als $HMnO_4$
5 ml für Ti, photometr. mit Chromotropsre.

Lösung Cu, Co, Ni
ansäuern, Cu elektrolytisch
Endbestimmung gravimetr.
oder maßanal. mit $Na_2S_2O_3$
Elektrolyt neutralisieren, auf 10 ml
5 ml für Ni, photom. mit Br_2-Dimethyldioxim 5 ml für Co, photom. mit NH_4CNS-Aceton

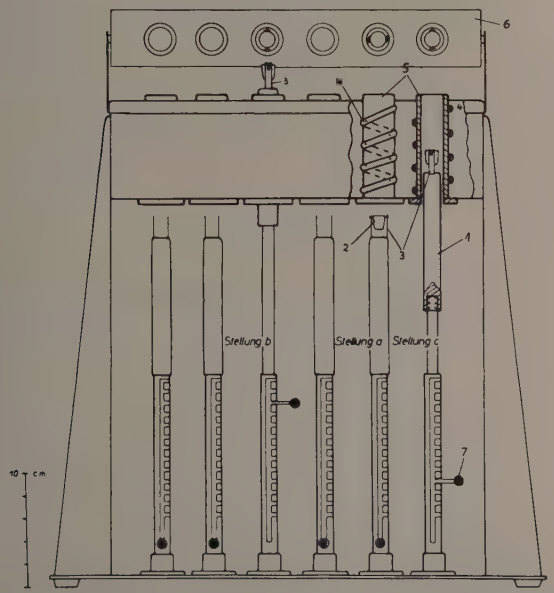


Abb. 3. Aufschluß- und Glüheinrichtung. 1 verstellbare Trägereinrichtung; 2 Mikrotiegel; 3 Aufhängevorrichtung; 4 Heizdraht; 5 Porzellanrohr; 6 Spiegel; 7 Verstellgriff

geglüht, wodurch einerseits die Carbide in die entsprechenden Oxyde übergeführt werden, andererseits ist aber der Glühverlust bzw. die Glühzunahme schon ein Anhaltspunkt für die Reinheit bzw. für das Vorhandensein einzelner Carbide. Die geglühten Carbide werden dann im Mikrotiegel mit Natriumperoxyd aufgeschlossen und die Schmelze in Wasser gelöst. Dabei gehen Chrom, Molybdän, Vanadium, Wolfram und teilweise auch Titan in Lösung, während Eisen, Mangan, Kupfer, Kobalt, Nickel und die Hauptmenge des Titans als Hydroxyde im Niederschlag zurückbleiben. Dieser Niederschlag wird mit Salzsäure gelöst und beide Lösungen werden auf je 25 ml aufgefüllt, woraus dann für die einzelnen Bestimmungen die entsprechenden Volumenanteile entnommen werden.

Tabelle 4

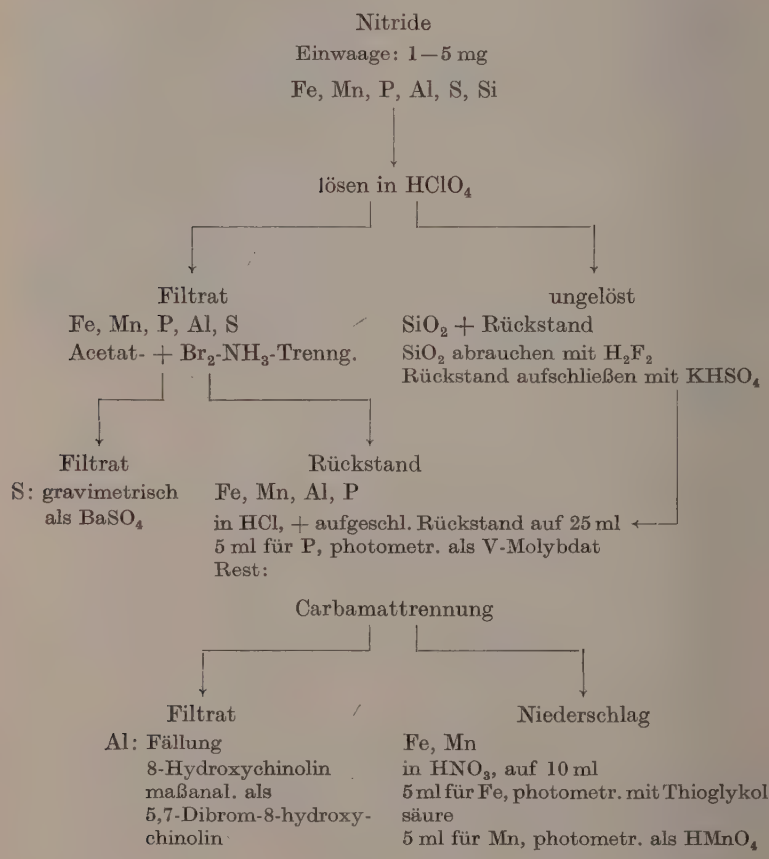
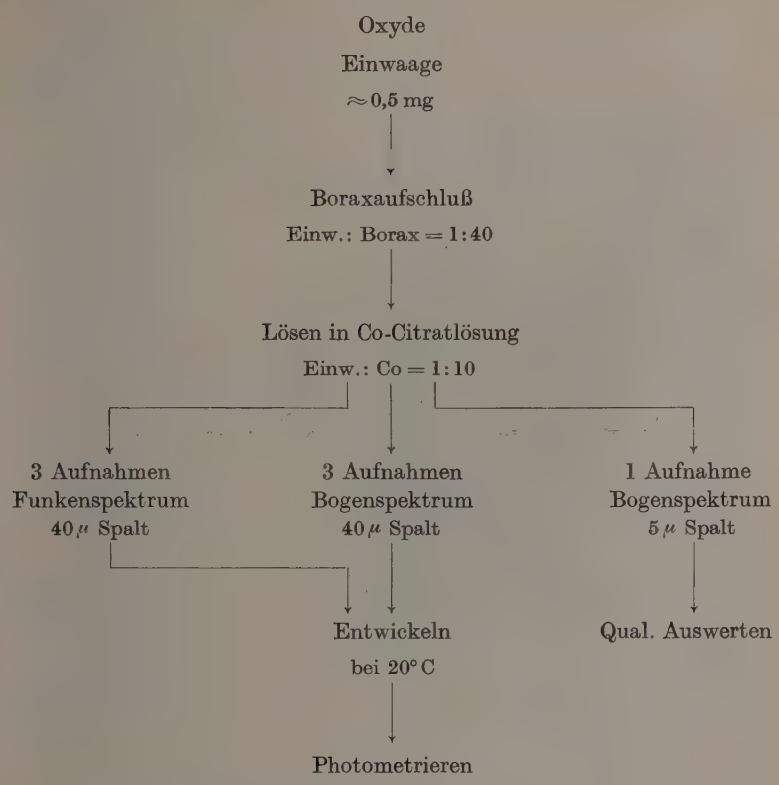


Tabelle 5



S-Werte der Linienpaare messen, z. B:

Al 3092,7—Co 2987,2	Mg 2936,5—Co 2987,2	Fe 2599,4—Co 2648,6
Mn 2933,1—Co 2987,2	Cr 2678,8—Co 2694,7	Si 2516,1—Co 2544,3
	Ti 3242,0—Co 3287,2	
	Ca 3179,3—Co 2544,3	

ΔY ermitteln
aus der Haupteichkurve die Konzentrationen bestimmen

Zur Untersuchung der Nitride kann man nach dem in Tabelle 4 aufgestellten Analysengang verfahren. Bei diesem Arbeitsgang erfaßt man durch Verwendung von Überchlorsäure aus einer Einwaage von 1 bis 5 mg neben Eisen, Mangan, Aluminium, Silicium z. B. auch Phosphor und Schwefel. Nach dem Lösen mit Perchlorsäure erhält man im Filtrat

Eisen, Mangan, Aluminium, Phosphor und Schwefel. Die beiden letzteren liegen als Phosphat- bzw. Sulfationen vor. Der ungelöste Rückstand besteht in der Hauptsache aus Siliciumdioxyd, woraus durch Abrauchen mit Flußsäure das Silicium bestimmt wird und wobei ein eventuell verbliebener Rückstand mit Kaliumpyrosulfat aufgeschlossen wird, um dann später der Lösung des Rückstandes aus der Acetat-Brom-Ammoniak-Trennung hinzugefügt zu werden. Im Filtrat dieser Trennung kann man den Schwefel bestimmen. Der gelöste Rückstand wird ebenfalls auf 25 ml aufgefüllt und davon werden 5 ml zur photometrischen Phosphorbestimmung entnommen, während der Rest einer Trennung mit Diäthyldithiocarbamat unterworfen wird.

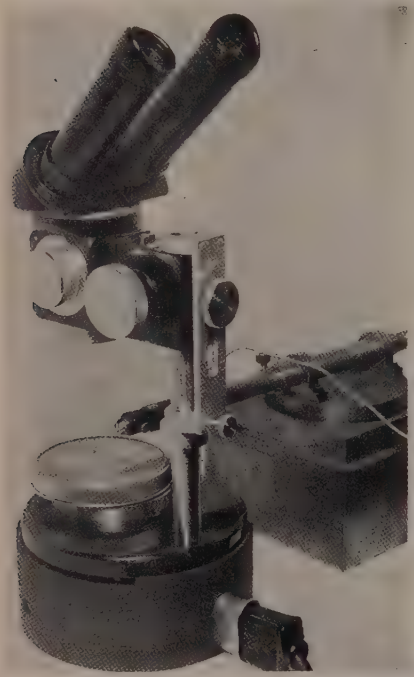


Abb. 4. Stereomikroskop mit Gleittisch und Mikromanipulator mit aufgesetztem Schmelzkopf

Grundsätzlich kann man die nach der Chlorvakuumtrennung[1] anfallenden Oxyde nach deren Aufschluß mikroanalytisch auf nassem Wege untersuchen. Im Interesse größerer Geschwindigkeit ist es aber zweckmäßig, in diesem Falle mikrospektralanalytisch zu arbeiten[5]. Die Menge der Oxyde ist üblicherweise sehr gering und daher mußte eine Methodik entwickelt werden, um den wichtigsten Arbeitsgang, den Aufschluß, mit möglichst kleinen Einwaagen sicher und einwandfrei durchzuführen. Die hierzu verwendete Apparatur, der Mikromanipulator[1] mit aufgesetztem Schmelzkopf, ist in Abb. 4 dargestellt. Mit ihr ist es möglich, bei Einwaagen von 20 bis 100 μg zu arbeiten. Hierbei werden in den vorgesehenen Fassungen entsprechende Platindrähte eingeklemmt, die über einen regulierbaren Widerstand elektrisch geheizt werden. Außerdem hat man hier die Möglichkeit, den gesamten Aufschlußvorgang, der sich in einer Perle abspielt, durch das Stereomikroskop zu beobachten und so den Zeitpunkt zu erfassen, bei dem der Aufschluß vollständig ist. Abb. 5 zeigt die einzelnen Phasen des Aufschlusses. Durch die elektrische Behei-

zung werden Nebenreaktionen, wie sie u. U. durch Verwendung der Gasflamme eintreten können, restlos ausgeschaltet. Darüber hinaus hat die Verwendung eines Platindrahtes und der elektrischen Heizeinrichtung gezeigt, daß es durchaus möglich ist, 15 bis 20 Aufschlüsse auch mit dem aggressiven Natriumperoxyd durchzuführen, bevor der Platindraht wesentlich darunter leidet. Nach dem Aufschluß wird die Boraxperle in einer Citratlösung, die bereits eine als innerer Standard dienende Menge Kobalt enthält, im Mikroplatintiegel gelöst und der Spektralanalyse zugeführt. Das Analysenschema der Oxyde ist in Tabelle 5 zu sehen.

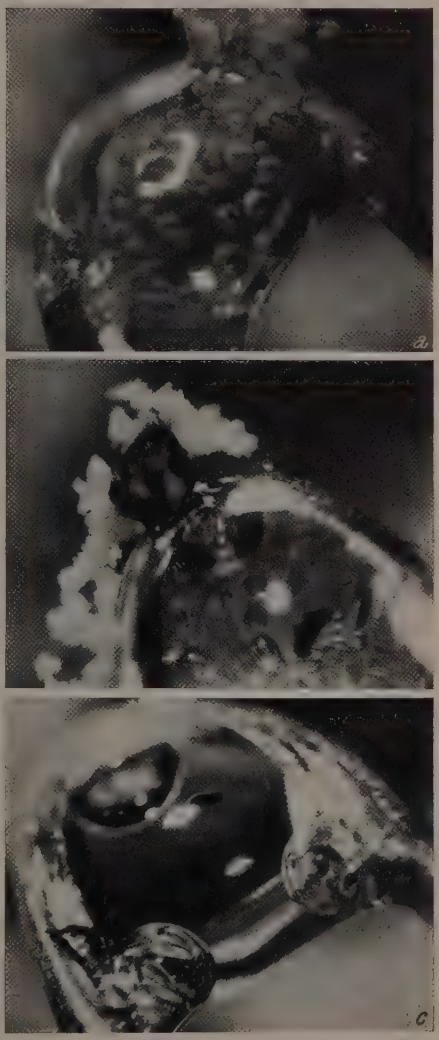


Fig. 5. *a* Erschmelzen der Perle. *b* Aufgenommenes, mit Aufschlußmittel umgebenes Partikelchen. *c* Endphase des Aufschlusses. Das Partikelchen ist fast gelöst

Zusammenfassung

Es wird die Bedeutung der Mikroanalyse in der Stahlforschung hervorgehoben und anhand einiger Analysengänge gezeigt, wie die einzelnen im Eisengefüge auftretenden Verbindungen analysiert werden können.

Summary

Stress is laid on the importance of microanalysis in the study of steels. On the basis of several analytical schemes, it is shown how the individual compounds occurring in iron structures can be analyzed.

Résumé

On met en évidence l'importance de la microanalyse dans les recherches sur l'acier. Quelques exemples montrent comment il est possible d'analyser les différentes combinaisons intervenant dans la structure de l'acier.

Literatur

[1] *W. Koch*, Mikrochim. Acta [Wien] **1954**, 760; *W. Koch* und *H. Malissa*; Arch. Eisenhüttenwes., im Druck.
[2] *D. Horstmann* und *H. Malissa*, Arch. Eisenhüttenwes., im Druck.
[3] *W. Koch* und *J. Bruch*, Arch. Eisenhüttenwes. **24**, 457 (1953).
[4] *W. Koch* und *H. Malissa*, Arch. Eisenhüttenwes., im Druck.
[5] *W. Koch* und *S. Eckhard*, Arch. Eisenhüttenwes., im Druck.

Aus dem Chemischen Laboratorium des Instituts für gerichtliche Medizin der Universität Wien

Studien zur quantitativen Bestimmung von Mikrogrammengen Blei

Von

F. X. Mayer † und P. Schweda

Mit 9 Abbildungen

(Eingelangt am 22. April 1955)

Die Methoden des Nachweises und der analytischen Bestimmung von Blei haben in den letzten 20 Jahren mit der zunehmenden Bedeutung dieses Schwermetalles in der modernen Toxikologie eine derartige Entwicklung erfahren, daß man sie mit gutem Recht als einen Spezialzweig der analytischen Chemie betrachten kann. Vor allem die Bestimmung sehr geringer Bleimengen hat viele Analytiker veranlaßt, Methoden auszuarbeiten, die unabhängig von dem klassischen Nachweis im Schwefelwasserstoffgang und der Sulfat- bzw. Chromatbestimmung die Messung von Mikrogrammmengen Blei möglich machen. Die Verfeinerung des Bleinachweises durch nephelometrische Bestimmung des Bleisulfids schloß an die alten klassischen Methoden an, die mit der Sulfat- und Chromatfällung in diesem Konzentrationsbereich versagt hatten. Die Einführung des Dithizons in die analytische Chemie durch *H. Fischer* wurde jedoch einer der entscheidenden Fortschritte in der Entwicklung des Spurennachweises. Dieser führte zu der Übertragung dieser Methode auf die verschiedensten Anwendungsgebiete, zu ihrer Verfeinerung und zur Aufdeckung bzw. Vermeidung ihrer Fehlerquellen usw. Nachdem durch fast ein Jahrzent die Dithizonbestimmung die fast ausschließlich untersuchte und angewandte Methode war, erwuchsen ihr nach und nach in den physikalisch-chemischen Methoden bedeutende Konkurrenten, vor allem in der spektrographischen Bestimmung, der Polarographie und der Konduktometrie.

Wir befaßten uns im Rahmen einer umfangreichen Arbeit über den Nachweis von Blei in biologischem Material mit der Verwendung von Dithizon bzw. der polarographischen Methode zur Bestimmung von Mikrogrammmengen Blei. Soweit die dabei erhaltenen Ergebnisse von allgemeinem analytischem Interesse sind, wird im nachfolgenden darüber berichtet.

I. Die Dithizonmethode

Eine grundlegende Änderung erfuhr die Bestimmung von kleinsten Mengen Blei durch das von *E. Fischer*[1] entdeckte und von *H. Fischer*[2–4]

in die analytische Chemie eingeführte Diphenylthiocarbazon, kurz Dithizon genannt*. Von *H. Fischer* und Mitarbeitern[5] hinsichtlich seiner Metallverbindungen und der Verwertbarkeit des Metallnachweises für die chemische Analyse genau untersucht, wurde das verhältnismäßig unspezifische Dithizon, gelöst in Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff, durch spezielle Bedingungen zu einem spezifischen Reagens. Durch geeignete Zusätze bzw. Reaktionsbedingungen können die einzelnen Metalle, die mit Dz wasserunlösliche Komplexverbindungen eingehen, die sich in organischen Solvenzien mit starken Färbungen lösen, eindeutig nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden.

Die spezielle Anwendung der Dithizonmethode auf die Bestimmung von Blei

Die Extraktionsgebiete der einzelnen Metalle sind leider nicht streng einem p_H-Wert zugeordnet, so daß eine Extraktion bei genau eingehaltenem p_H nicht spezifisch für die Entfernung eines einzelnen Metalles aus einer Mischung von mehreren ist. Die Extraktion bestimmter Metalle verläuft in einem mehr oder minder breiten p_H-Intervall. Es gelingt aber durch geeignete Zusätze und Reaktionsbedingungen, in diesen Bereichen wieder Auslesen zu treffen und somit die Metallextraktionen weitestgehend zu spezifizieren.

Das Extraktionsgebiet des Bleis liegt zwischen p_H 5 und 10. In neutraler Lösung ist die Mehrdeutigkeit der Reaktion 14, das heißt, es reagieren fast alle mit Dz extrahierbaren Metalle. In cyanidhältiger Lösung vermindert sich die Mehrdeutigkeit auf 3: mit Blei werden noch Zinn, Thallium und Wismut extrahiert. In vorher oxydierten Kaliumcyanidlösungen ist schließlich nur mehr die Eindeutigkeit 1 gegeben: neben Blei reagiert noch Wismut.

Die Koinzidenz von Blei mit Wismut bei der Dithizonextraktion

Eine bedeutende Schwäche der exakten Bleibestimmung mit Dz liegt in der Tatsache begründet, daß unter den Bedingungen des Nachweises neben Blei auch Wismut extrahiert wird. Es ist unmöglich, auch nur auszugsweise die Arbeiten anzuführen, die über den störenden Einfluß des Wismuts auf die Bleibestimmung vorliegen. Die folgenden Literaturangaben sind eine Auslese der wichtigsten, um sich an Hand der Originalarbeiten einen möglichst guten Überblick über das Problem verschaffen zu können:

H. Fischer[7] extrahiert das Blei neben Wismut im normalen Gang mit dem Unterschied, daß er die Cyanidgaben erhöht (10% KCN statt 5%) und den Bleiextrakt dann mit 1%iger KCN-Lösung so lange wäscht, bis die wäßrige Schicht farblos ist. Auf diese Weise soll man noch 0,5 μg Blei neben 1 mg Wismut nachweisen können. Für die quantitative Bestimmung von Blei neben Wismutmengen bis zu 1 mg schlägt er neben diesen Angaben[7, 8] die vorherige Abtrennung der Hauptmengen Wismut bei p_H3 durch Dz-

*) im folgenden wird für Dithizon, die von *P. L. Hibbard* (6) vorgeschlagene Bezeichnung Dz verwendet.

Extraktion vor und schließt daran bei p_H 9 und einem KCN-Überschuß die Bleiextraktion, ohne auf Spuren Wismut noch Rücksicht zu nehmen, die in dieser alkalischen Lösung nicht mehr reagieren.

H. Taeger[9] beruft sich auf *H. Fischer* und *G. Leopoldi*[5], die bereits darauf hinwiesen, es sei „in Gegenwart von Zinn und Wismut ohne jede weitere Trennung das Blei quantitativ zu bestimmen, sofern die Menge dieser Metalle die zu bestimmende Bleimenge nicht um mehr als das Zwei- bis Dreifache übersteigt, und die gefärbte organische Phase oft (drei- bis viermal) mit einer 1%igen KCN-Lösung gewaschen wird . . .[10, 11]".

In der amerikanischen Literatur wird eindeutig der Wismutentfernung bei p_H 2 bis 3,5 und der anschließenden Endbestimmung des Bleis der Vorzug gegeben. Die gebrachten Beleganalysen beweisen, daß es möglich ist, bis zu 0,5 mg Wismut durch eine Vorextraktion zu entfernen. Bei Wismutmengen von mehr als 500 μg werden entsprechend kleinere Teile verwendet, um unter diesen kritischen Bereich zu kommen[12—16].

Die Methode der Wismutextraktion bei geringem p_H wurde von uns an Testlösungen erprobt. Wir haben dabei gute Werte erhalten. Für die Wahl der Wismutentfernung durch eine Vorextraktion waren uns folgende Gründe maßgebend:

1. Die Vorextraktion bei p_H2 ist so einfach und schnell durchzuführen und die überprüften Beleganalysen zeigten so befriedigende Ergebnisse und Übereinstimmung mit den Literaturangaben, daß darin Grund genug lag, von weiteren Testmessungen guten Gewissens absehen zu können.

2. Schon die einmalige Behandlung der Bleiextrakte mit 1%iger KCN-Lösung führt, wie wir im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigen werden, unweigerlich zu Bleiverlusten, erst recht mehrmalige KCN-Behandlungen. Es besteht mithin die Gefahr, daß durch Wismut bedingte höhere Werte eventuell durch einen Bleiverlust mehr oder minder kompensiert oder sogar überkompensiert werden. Die Vorextraktion ist daher als die exaktere Methode anzusprechen.

Verschiedene Ausführungsformen der Dithizonbestimmung

Die Anwendung kann im kolorimetrischen Einfarbenverfahren, im kolorimetrischen Mischfarbenverfahren oder als Titrationsmethode erfolgen. Die zu untersuchende mineralsaure Lösung, deren Bleigehalt bis zu zirka 150 μg betragen darf und die zur Überführung von Tl(I) in Tl(III) und Sn(II) in Sn(IV) vorher oxydiert wurde, wird hierauf mit Ammoniak bis zur neutralen bzw. schwach alkalischen Reaktion versetzt und durch Zugabe von Citrat die Abscheidung von unlöslichen Metallhydroxyden unterbunden. Zur Maskierung von Zink wird Kaliumcyanid, und zur Verhütung einer Oxydation des Dz Hydroxylamin-Chlorhydrat zugesetzt. Hierauf wird mit einer Lösung von Dz in Tetrachlorkohlenstoff solange extrahiert, bis die ursprüngliche Grünfärbung des Dz bestehen bleibt.

Beim Einfarbenverfahren wird nun das überschüssige Dz durch wiederholtes Schütteln mit alkalischen Waschflüssigkeiten entfernt und entweder die rote Bleidithizonat-Lösung oder das daraus durch Ansäuern in Freiheit gesetzte, dem Metall äquivalente, grüne Dz photometriert.

Im Gegensatz dazu wird beim Mischfarbenverfahren, die aus dem grünen Dz-Überschuß und dem roten Bleidithizonat bestehende Mischfarbe kolorimetriert. Für dieses Verfahren muß das Dz in Chloroform gelöst werden, da im neutralen bzw. alkalischen Bereich das Dz aus Chloroform bedeutend weniger in die wäßrige Phase übergeht als dies bei Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel der Fall ist. Ferner ist eine Vorextraktion zur ungefähren Bestimmung des Bleiwertes unerläßlich, da es notwendig ist, für die einzelnen Bleibereiche (0 bis 10, 0 bis 50, 0 bis 100 μg) korrespondierende Lösungen von Dz in Chloroform zu verwenden[17—19].

Der Wert der Titrationsmethode ist für Serienbestimmungen fraglich. Sie wird daher nur angeführt und hinsichtlich näherer Angaben auf die Literatur verwiesen[12, 20, 21].

Wir haben unseren Serienbestimmungen die Einfarbenmethode zugrunde gelegt. Es war aber notwendig, die Bedingungen, unter denen sie ausgeführt wird, genau festzulegen bzw. zu überprüfen.

Die Bedeutung des p_H-Wertes für die quantitative Extraktion des Bleis mit Dithizon

Da die Extraktion des Bleis erst bei einem Wert von p_H 4 beginnt, ist es notwendig, die saure Analysenlösung vor der Extraktion zu neutralisieren. Dafür werden nun von einzelnen Autoren verschiedene Indikatoren mit deutlich verschiedenen Umschlagsbereichen angeführt. Da nähere Erläuterungen oder Messungen nicht angeführt werden, wurde die Abhängigkeit der Extraktion vom p_H-Wert der Lösung untersucht.

Als Grundlage für die Darstellung dieser Abhängigkeit soll die Extraktion von 16,2 μg Blei bei verschiedenen p_H-Werten gewählt werden.

Die Analysenlösung enthielt folgende Zusätze:

10 ml Na-Citrat-Lösung, 10%ig,
5 ml KCN-Lösung, 5%ig,
5 ml $NH_2OH \cdot HCl$, 10%ig.

Extrahiert wurde mit 5 ml einer Dz-Lösung, die 5 mg % Dz gelöst in Tetrachlorkohlenstoff enthielt, durch 2 Minuten langes Schütteln. Nach Trennung der Phasen wurde mit reinem CCl_4 nachgewaschen und die vereinigten Extrakte mit Ammoniak (1 : 200) gewaschen. Einmal wurde daraufhin mit 10 ml 0,5%iger KCN-Lösung und nachfolgend mit weiteren 5 ml 0,5%iger KCN-Lösung geschüttelt. Die gesammelten Waschflüssigkeiten wurden zweimal mit je 2 ml reinem CCl_4 nachgewaschen. Die vereinigten Extrakte, einmal mit 10 ml bidest. Wasser gewaschen, wurden in einen zweiten Scheidetrichter übergeführt und mit 10 ml 1%iger HNO_3 geschüttelt, filtriert, auf 20 ml aufgefüllt und im Pulfrich-Photometer gemessen (Filter S 61).

Der p_H-Wert wurde nach erfolgter Extraktion gemessen:

Röhrenvoltmeter: Andreatta, Innsbruck.
Meßkette: Glaselektrode (Ag—AgCl) ges. Kalomelelektrode.
Meßgenauigkeit: $\pm$ 0,02 p_H.

Alle angegebenen eigenen p_H-Werte wurden mit diesen Einrichtungen

und unter diesen Bedingungen gemessen und auf Temperatur und Alkalifehler korrigiert.

Die Abhängigkeit der Extinktionswerte E vom pH der Extraktionslösung bei einem Bleigehalt von 16,2 μg zeigt Abb. 1.

Die ersten meßbaren Bleiwerte treten bei einem pH von ca. 5,7 auf und sind wegen der Kleinheit ihrer Extinktionswerte naturgemäß ziemlich

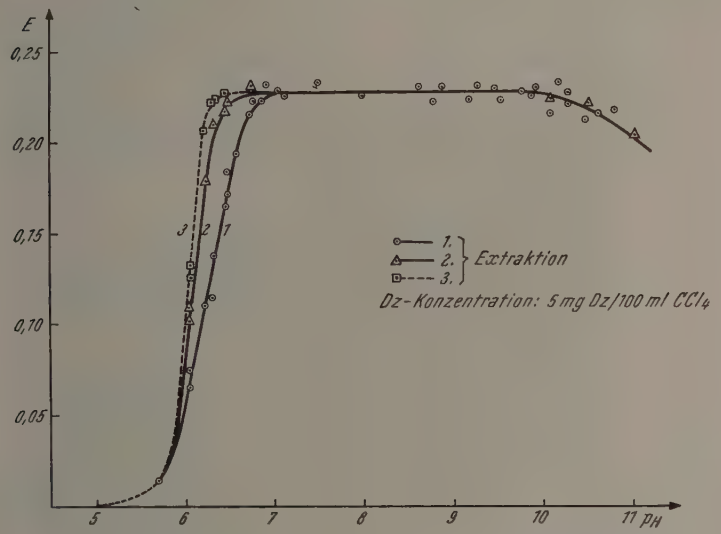


Abb. 1. Abhängigkeit der Extinktionswerte E vom pH der Extraktionslösung

ungenau (gestrichelter Kurvenanfang). *H. Fischer*[22] gibt an, daß bereits bei einem pH von 3,6 bis 4,0 Mengen bis zu 1 μg Blei gefunden wurden. Selbst wenn diese Spuren schon bei einem so tiefen pH-Wert der zu extrahierenden Lösung aufträten, könnte man sie unter den angegebenen Bedingungen nicht nachweisen, da die Löslichkeit des Bleidithizonats in den alkalischen Waschflüssigkeiten ungefähr in dieser Größenordnung liegt. Von pH$\sim$ 6 an erreicht man Extinktionswerte, die den Meßgenauigkeiten genügen. Die Kurve steigt steil an und erreicht bei pH 7 ihren Maximalwert, d. h. vollständige Extraktion. Wie die Kurve 1 also zeigt, wird bei einmaliger Extraktion mit 5 ml einer 5 mg%igen Dz-Lösung in CCl_4, mit der 2 Minuten kräftig geschüttelt wurde, erst bei einem pH-Wert von 7 der Endwert der Extraktion erreicht. Bei einmaligem Nachschütteln mit der gleichen Dz-Lösung unter denselben Bedingungen verläuft die Kurve steiler und erreicht bei pH 6,7 den Grenzwert: Kurve 2. Die Verhältnisse beim dritten Ausschütteln zeigt

Kurve 3. Man sieht also, daß bei dreimaligem Ausschütteln einer Bleimenge von 16,2 μg mit einer Dz-Lösung von 5 mg% bei einem pH-Wert von ca. 6,5 vollständige Extraktion erreicht wird. Die Verhältnisse sind bei Anwendung konz. Dz-Lösungen etwas anders; denn bei einem größeren Dz-Überschuß reagiert Blei schneller und die Kurve 1 rückt weiter an die Kurve 2 und so fort, ohne die Grenzverhältnisse, die durch Kurve 3 gegeben sind, wesentlich zu verändern.

Die Anwendung eines großen Dz-Überschusses ist insofern ungünstig, als die Empfindlichkeit des Dz bei höherer Konzentration geringer[23], die Endpunkterkennung erschwert wird und natürlich das überschüssig zugeführte Dz nach vollendeter Extraktion wieder entfernt werden muß. Die dazu verwendeten größeren Mengen alkalischer Waschflüssigkeit bringen Komplikationen mit sich, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

Im pH-Gebiet 7 bis 10 wird die Menge von 16,2 μg Blei durch eine einmalige Extraktion vollständig extrahiert. Die ansteigende Kurve geht in eine Gerade über. Es ist dies das günstigste Extraktionsgebiet, in dem bei geringstem Aufwand an Zeit und Reagenslösung vollständige Extraktion erreicht wird.

Von pH ~10 an zeigt sich, wie unter anderem auch *H. Fischer*[7] angibt, daß das Bleidithizonat einer mehr oder minder weitgehenden Zersetzung unterliegt. Infolge der starken Pufferwirkung in diesem Gebiet sind pH-Werte über 10 nur durch große Mengen an konz. Ammoniak zu erreichen. Oberhalb pH 10,5 wurde daher nicht mehr gemessen. Bei günstig gewählten Indikatoren ist es kaum möglich, diesen kritischen pH-Wert zu überschreiten. Weitere Messungen in diesem Bereich wurden aber vor allem deshalb nicht gemacht, weil im folgenden Teil die Einwirkung von alkalischen Waschlösungen (die also eindeutig und leicht erreichbar in pH-Gebieten über 10 liegen) auf das Bleidithizonat untersucht wird.

Ein weiteres Übel der Extraktion bei pH-Werten unter 7 ist, daß beim Ausschütteln oft kräftige Dz-Rotfärbungen erhalten werden, die mehrmalige Extraktionen notwendig machen und größere Bleimengen vermuten lassen. Bei KCN-Behandlung der Extrakte, wobei die Rotfärbungen sehr oft fast ganz verschwinden, stellt sich dann heraus, daß die mehr oder minder intensive Farbe gar nicht, bzw. nur teilweise von anwesendem Blei stammt, sondern von einem mitextrahierten Begleitstoff herrührt. Die Farbe und ihre KCN-Empfindlichkeit wiesen schon auf Zink hin, identifiziert und vermessen wurde es polarographisch. Aus den erhaltenen Werten ließen sich keine Regelmäßigkeiten erkennen, weshalb von ihrer Veröffentlichung abgesehen wird. *Die Tatsache aber wurde bestätigt: In schwachsaurem Gebiet wird aus Lösungen, die KCN*

enthalten, mit Blei auch Zink extrahiert; dieses kann somit höhere Bleiwerte vortäuschen[24]. Durch KCN-Waschungen wird das Zink zwar wieder vollständig entfernt; das ändert aber nichts daran, daß es die Abschätzung der ungefähren Bleiwerte unmöglich macht, die Endvolumina vergrößert und durch lange Extraktionsdauer einen beträchtlichen Mehraufwand an Zeit und Arbeit veranlaßt. Ein vergrößerter KCN-Zusatz ändert daran nichts, falls man damit im sauren Bereich bleibt. Erst wenn man einen höheren p_H-Wert als 7 einstellt bzw. durch die zusätzlichen Gaben von KCN ins alkalische Gebiet kommt, gelingt es, das Zink vollständig zu maskieren. Auch hier ist es also möglich, durch geeignete Wahl des Indikators zusätzliche Mengen KCN zu vermeiden. Die Erscheinung ist wahrscheinlich damit zu erklären, daß im sauren Gebiet die Cyanionen-Konzentration zur Maskierung des Zinks nicht ausreicht.

Nach den Messungen ergab sich für die Extraktion des Bleis mit Dz, gelöst in CCl_4, als optimaler Bereich das Gebiet zwischen p_H 7 und 10. Dies ist für die Auswahl der für die Neutralisation in Frage kommenden Indikatoren von Bedeutung.

Wir verwendeten Thymolblau, das ein Umschlagsgebiet von p_H 8,0 bis 9,6 und eine Halbwertstufe von p_H 8,89 hat. Der naheliegende Einwand, daß der Grenzwert des Thymolblauumschlages von 9,6 ja auch bedenklich nahe am ebenfalls absteigenden alkalischen Ende der Kurve liegt ($p_H \geqq 10$), kann damit beantwortet werden, daß man bei genauem Neutralisieren zu einem p_H-Wert gelangt, der etwa dem Halbwertstufenwert des Indikators entspricht. Außerdem befindet man sich im kritischen Gebiet von $p_H \backsim 10$ in einem Bereich ausgezeichneter Pufferung, so daß selbst ein größerer Zusatz von konz. Ammoniak den p_H-Wert praktisch nur wenig verändert.

Von dem Gebrauch von Bromkresolpurpur als Indikator (Umschlagsgebiet p_H 5,2 bis 6,8; Halbwertstufe p_H 6,27), wie ihn unter anderem auch *H. Taeger* in seiner umfassenden Bleiarbeit empfiehlt[9], ist abzuraten. Von der unpraktischen Mehrarbeit einer dreimaligen Extraktion, vom Dz-Verbrauch und von der Vergrößerung des Endvolumens abgesehen, liegt der Nachteil des gewählten p_H-Gebietes darin, daß es nur möglich ist, zu p_H-Werten $< 6{,}2$ zu gelangen, bei denen eine vollständige Extraktion nicht mehr zu erreichen ist.

Es ist darauf hinzuweisen, daß auch *H. Fischer*[7] Thymolblau als Indikator empfiehlt und daß bereits *H. Müller*[24] als das günstigste Extraktionsgebiet das Milieu zwischen p_H 7 und 10 bezeichnete. Leider genügten die sechs Extinktionswerte, die er für 20 μg Blei bei p_H-Werten von 7,0, 8,0, 8,8, 9,6, 10,2 und 11 anführte, nicht zur Konstruktion einer Kurve der beschriebenen Art und nicht dazu, die Verhältnisse mit genügender Übersicht zu verfolgen.

Bleiverluste durch alkalische Waschflüssigkeiten

Nach erfolgter Extraktion des Bleis durch Dz muß bei der Einfarbenmethode die organische Phase mit Lösungen behandelt werden, deren pH eindeutig über 10 liegt, und zwar:

1. Zur Entfernung des überschüssigen Dz;
2. Zur Entfernung eventueller Spuren von Zn, Bi, Sn, Tl.

Dies erfolgt unter Verwendung von stark verdünntem Ammoniak bzw. von verdünnten KCN-Lösungen.

Namentlich in den älteren Vorschriften *H. Fischers*[2, 4, 5] und anderer Autoren[9, 10, 24] wird eine sehr verdünnte Ammoniaklösung (1 : 200) zur Entfernung des überschüssigen Dz empfohlen. Je nach der Größe des Dz-Überschusses sollen mehr oder weniger Ausschüttelungen mit NH_3 vorgenommen werden, bis die wäßrige Phase keine Gelbfärbung mehr zeigt. Die Gelbfärbung ist auf das überschüssige Dz, das als Alkalisalz in Lösung geht, zurückzuführen. Die Waschungen mit Ammoniak sind jedoch ohne weiteres vermeidbar. Die Unumgänglichkeit der KCN-Waschung (Zn, Bi, Tl, Sn-Entfernung) führt ohnehin in alkalisches Gebiet, indem Bildung von wasserlöslichem Dz-Alkalisalz eintritt. Die Alkalität einer 1- bzw. 0,5%igen KCN-Lösung führt also neben der Entfernung von Verunreinigungen zur Überführung von freiem, überschüssigem Dz in sein Alkalisalz und damit zu seiner restlosen Entfernung. Als Beweis dafür wird in Abb. 2 die Abnahme der Extinktionswerte dreier verschiedener Dz-Lösungen (Ausgangsmenge: 5 ml) durch einmaliges, 15 Sekunden dauerndes Ausschütteln mit Puffern bei verschiedenen Wasserstoffionen-Konzentrationen dargestellt.

Nach *H. Fischer*[7] soll aus CCl_4 Dz merklich erst bei pH 10 übergehen. Wie man sieht, liegen die Verhältnisse tatsächlich günstiger, denn bei einem pH-Wert von 10 findet man von einer Dz-Lösung der Extinktion 1,648 bei einmaligem Ausschütteln nur mehr ca. 7%. Bei einem $pH > 11$ (z. B. in 0,5%iger KCN-Lösung) wäre überschüssiges Dz durch eine einmalige Extraktion restlos entfernt worden. Trotzdem wurde an der von *H. Fischer* selbst geübten, wenn auch nicht besonders erwähnten Gewohnheit festgehalten, zweimal mit 0,5%iger KCN-Lösung zu waschen, um Fehler durch eventuelles Zurückbleiben von Dz ganz sicher zu vermeiden.

Die besonderen Daten der Bleiverluste durch NH_3-Waschungen werden an dieser Stelle übergangen, weil im nachfolgenden Teil der Einfluß von KCN-Lösungen auf das Bleidithizonat diskutiert wird. Beide Effekte sind durch ein $pH > 10$ bedingt und die Verlustwerte durch NH_3-Waschungen sind, wenn man den pH-Wert der Ammoniaklösung kennt (NH_3 1 : 200 ist ein verhältnismäßig ungenauer Begriff), ohne weiteres an der korrespondierenden KCN-Verlustkurve abzulesen.

Wie bereits erwähnt, bewirkt das Waschen mit KCN-Lösungen verschiedenen Prozentgehaltes einesteils die Entfernung von Spuren Zn, Bi, Tl und Sn, andernteils wird überschüssiges Dz entfernt. Anfangs

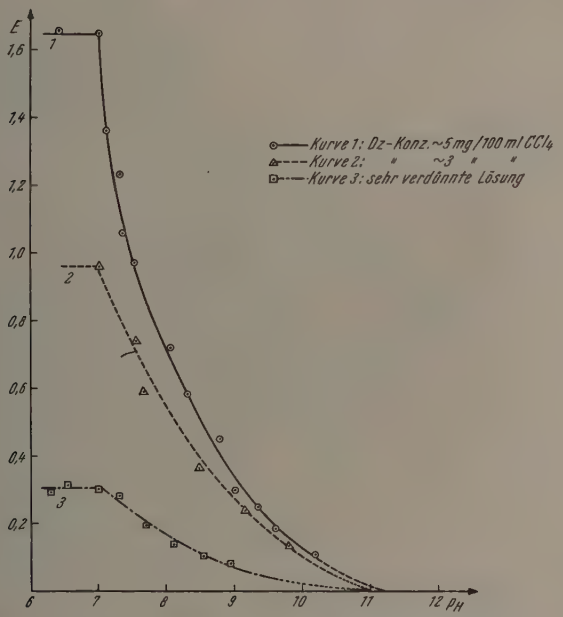


Abb. 2. Abnahme an freiem Dz durch Ausschütteln bei verschiedenem p_H

wurde von uns eine 1%ige Lösung von KCN als Waschflüssigkeit verwendet. Dabei wurde bemerkt, daß Bleitestwerte um so tiefer lagen, je öfter sie mit dieser Lösung geschüttelt wurden. Auch geringe Rotfärbungen von Extrakten (namentlich bei Blindwertbestimmungen) verschwanden nach der Behandlung mit 1%iger KCN-Lösung und wurden daher vielfach als Fremdstoffe bezeichnet. Erst Versuche mit reinsten Bleilösungen und frisch destilliertem NH_3 zeigten, daß weder Zink- noch Thallium-Verunreinigungen das Verschwinden bzw. Abnehmen der Rotfärbungen erklären konnten, sondern daß sich der Angriff des KCN in einem bestimmten Maße gegen das Bleidithizonat selbst richtet. Versuche mit Puffern ließen auch bald erkennen, daß es sich nicht um ein spezifisches Verhalten des Kaliumcyanids bzw. seiner Ionen handeln konnte, sondern daß die Erklärung in einer gewissen p_H-Empfindlichkeit des Bleidithizonats liegen müsse. Auch die daraufhin durchgesehene Literatur wies in diese Richtung[17, 24, 25]. Selbst *H. Fischer* schreibt[7],

daß das Bleidithizonat bei pH > 10 mehr oder weniger Zersetzung erleidet, und macht Angaben über den absoluten Bleiverlust bei 19,6 µg. Es wurden nun Versuche unternommen, die Verluste durch KCN-Waschungen mengenmäßig festzustellen. Die Ergebnisse werden an einer Bleilösung der Extinktion 0,2281 gezeigt, die mit 10 ml Cyanidlösung verschiedenen Gehaltes und daher verschiedenen pH-Wertes, einmal 10 Sekunden lang ausgeschüttelt wurde (Abb. 3).

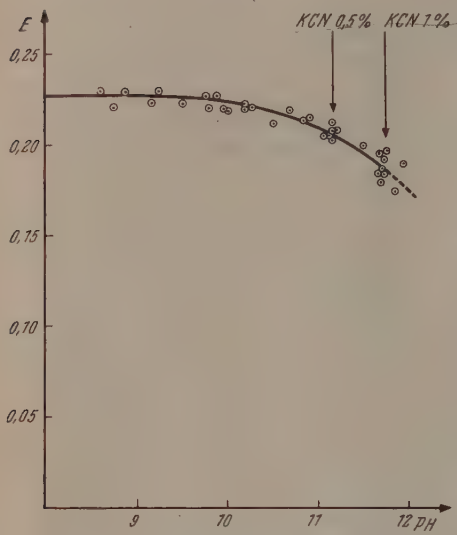


Abb. 3. „Zersetzungskurve" des Pb-Dithizonats durch Waschen mit KCN-Lösungen

Die Bleiverluste beginnen bei einem pH-Wert von ca. 10,3 über den Streuungsfehler hinauszugehen und erreichen bei pH 11,2 die Toleranzgrenze von 10%. Nimmt man nun an, daß eine 1%ige KCN-Lösung ein pH von etwa 11,7 hat (eine genauere Zahl ist hier nicht anzugeben), so sieht man aus der Darstellung, daß bereits eine einmalige Waschung mit dieser Lösung im angegebenen Bereich einen Fehler von ca. 16,5% verursacht. Unter der Voraussetzung, daß KCN-Waschungen unvermeidlich sind, muß man also bestrebt sein, einen pH-Wert einzuhalten, der höchstens einen Verlust innerhalb der 10%igen Toleranz verursacht. Eine frisch bereitete 0,5%ige KCN-Lösung hat nun z. B. nach eigenen Messungen einen durchschnittlichen pH-Wert von 11,2 und eignet sich daher besser. Am besten zu empfehlen ist, die KCN-Lösung auf einen pH-Wert von 11 einzustellen, da dann neben den geringeren Verlusten die Entfernung von Spurenverunreinigungen noch vollkommen gewährleistet ist. Der triftige Einwand, daß sich bei gleichartig behandelten Proben der Fehler selbst eliminiert, müßte für genaueste Bestimmungen und Eichgerade dahingehend präzisiert werden, daß man außer den minutiös gleichen Mengen an Waschflüssigkeiten auch deren pH-Werte zeitweilig kontrolliert (KCN verändert diesen) bzw. bei neuangesetzten KCN-Lösungen diesen Wert bestimmt oder jeweilige Korrekturen errechnet. Besonders problematisch sind Angaben, die z. B. für Blei-Wismut-Trennungen anführen: „Die gefärbte organische Phase wird oft (drei- bis viermal) mit einer 1%igen KCN-Lösung gewaschen, bis die über-

stehende Phase farblos bleibt", die wörtlich aus *H. Taegers* Zusammenstellung[9] zitiert wird, die aber auf *H. Fischer* zurückgeht[7]. Wieweit eine Wismutverunreinigung hiebei durch einen Bleiverlust kompensiert wird bzw. wie groß die Bleiverluste sind, ist dabei ungeklärt. *Darum: Wenn Eichkurven unter gleichen Bedingungen nicht vorliegen oder keine Korrekturen errechnet wurden, muß auf der Entfernung des Wismuts durch eine Vorextraktion bestanden werden.*

Eine weitere Folge dieser Verluste ist, daß Mengen von Pb $\leq 1{,}5\ \mu g$ auch theoretisch nicht mehr zu bestimmen sind. Die praktischen Grenzwerte sind durch den Filterfehler des Photometers und die verschwindend geringen Farbintensitäten gegeben. Die Testkurven gehen daher nicht durch den Ursprung, wie z. B. *H. Taeger* angibt[9], sondern schneiden die Abszisse in einem bestimmten Abstand von der Ordinate, der in erster Linie von der Zahl der Ausschüttelungen mit alkalischen Waschlösungen, und dem p_H-Wert, bei dem sie erfolgten, abhängt. Dieser Effekt ist wohl zu unterscheiden von einer unvollständigen Extraktion, die ein ähnliches Bild mit meist größeren Abweichungen gibt. Es handelt sich hier um einen Differenzbetrag, der bei sorgsamst eingehaltenen Bedingungen durch mehr oder minder große Bleiverluste in der alkalischen Waschflüssigkeit entsteht. Bei Blindwertbestimmungen muß z. B. durch geeignete Wahl des Ausgangsvolumens dieser Tatsache Rechnung getragen werden.

Abschließend kann an Hand der Meßergebnisse nochmals darauf hingewiesen werden, daß

1. die alkalischen Waschflüssigkeiten in genau abgemessenen, gleichen Mengen unter zeitweiliger bzw. informativer Kontrolle ihres p_H-Wertes angewendet werden müssen oder die Verwendung von Puffern in Betracht zu ziehen ist; daß

2. Differenzen, die die verlangte Genauigkeit überschreiten, in Rechnung gestellt werden oder Meßwerte nur an Hand gleichermaßen (Volumen, Prozentgehalt und p_H-Wert der Waschlösungen) hergestellter Eichkurven verglichen werden dürfen, und daß

3. bei Anwesenheit von Wismut dieses durch eine vorangehende Vorextraktion, nicht aber durch gesteigerten Verbrauch alkalischer Waschflüssigkeiten entfernt werden muß.

II. Die Bestimmung von Mikrogrammengen Blei auf polarographischem Wege

Da die Grundlagen der Polarographie als bekannt vorausgesetzt werden dürfen[26—29], braucht hier nur kurz zusammengefaßt werden:

Die polarographische Bleibestimmung ist einfach und genau durchzuführen. Die Bleistufe ist sehr genau zu bestimmen[30, 31], läßt bezüglich

der Elektrolyte weiteste Wahl und ist gut neben anderen Metallionen meßbar. Das Sauerstoffmaximum ist leicht zu dämpfen, wenn man einige Vorsichtsmaßregeln beachtet[32, 33]. Wir verwendeten als Dämpfungsmittel 0,01%ige Gelatinelösung, die mit Toluol stabilisiert war. Der Sauerstoff ist durch einen inerten Gasstrom leicht auszutreiben[30, 31]. Die Grund- und Grenzströme sind gut ausgebildet und die Halbstufenpotentiale in den verschiedenen Elektrolytlösungen liegen günstig. Zur Bestimmung von Mikrogrammmengen Blei muß der Kondensatorladungsstrom kompensiert werden, was mit Hilfe der Kompensationsmethode von *D. Ilkovič* und *G. Semerano*[34] zufriedenstellend gelingt. Die konzentrationsabhängige Stufenhöhe wurde nach der exakten Methode[18, 30] gegen den Reststrom vermessen. Die Galvanometerschwingungen wurden durch einen parallel zum Galvanometer im Nebenschluß geschalteten Kondensator (Elko) von 2000 Mikrofarad gedämpft[35]. Als Polarograph wurde das Gerät der Fa. E. Leybold, Köln, mit photographischer Registrierung verwendet. Als Galvanometer diente ein Instrument der Fa. Hartmann & Braun mit der Empfindlichkeit $E = 2{,}6 \times 10^{-9}$ Amp./mm bei 1 m Entfernung von der Phototrommel.

Grundelektrolyte:

Da die Bleibestimmung in saurer, neutraler und alkalischer Lösung möglich ist, kann sich die Wahl der Grundlösungen nach den Gesichtspunkten größter Meßgenauigkeit und praktischester Arbeitsmethodik richten. Darüber hinaus ergibt sich die Möglichkeit, durch Wahl verschiedener Grundelektrolyte neben Blei noch andere Elemente bestimmen zu können. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde hauptsächlich mit Salzsäure bzw. Salpetersäure als Grundelektrolyt gearbeitet, da hiemit die Aufarbeitung der Untersuchungssubstanzen erleichtert wurde und gut ausgebildete Bleistufen mit günstigen Wellenhöhen erhalten wurden.

Die Koinzidenzen von Blei mit Wismut, Zinn und Thallium bei der polarographischen Bestimmung:

Da hier vor allem Metalle interessierten, mit deren Vorkommen in biologischem Material gerechnet werden mußte, sei es, daß sie als normale Begleitstoffe, als Verunreinigungen (Konserven, Geschirr usw.) oder als Vergiftungen aller Grade auftreten, werden in Tabelle 1 die Halbstufenpotentiale der vor allem interessierenden Metalle Bi, Zn, Sn und Tl neben Blei in verschiedenen Grundelektrolyten angeführt. Die Potentialangaben sind in Volt gegen die bei 25° C an KCl gesättigte Kalomelelektrode angegeben.

Störungen durch Koinzidenzen treten im Gegensatz zur Dz-Methode, bei der polarographischen Bleibestimmung also nicht auf. Damit fallen nicht nur umständliche Modifikationen zur Vermeidung von Fehlerquellen weg, sondern man kann darüber hinaus einzelne Begleitstoffe in einer einzigen Aufnahme nebeneinander erkennen und bestimmen.

Tabelle 1

Elektrolyt	Pb^{2+}	Bi^{3+}	Zn^{2+}	$Sn^{4+\rightarrow 2+}$	Tl^{+}
1-n HCl	−0,43	−0,09	H^+	—	−0,49
1-n HNO_3	−0,40	−0,01	H^+	—	−0,47
Saure Tartratlösung	−0,48	−0,29	−1,23	—	−0,47
1-n NaOH.....	−0,76	—	−1,53	—	−0,49
Alkalische Tartratlösung	−1,32	−(1,0)	−1,42	—	−0,49
0,1-n KCl	−0,40	—	−1,0	—	−0,47

Bi: Wie man aus der Tabelle ersieht, ist die Bleibestimmung neben Wismut in allen sauren Grundelektrolyten und in Tartratlösungen ohne weiteres möglich, wenn kein Wert auf Angaben über den Wismutgehalt gelegt wird, auch in alkalischen Elektrolyten. Die Schwierigkeiten der Wismutkoinzidenzen, wie sie bei der Dz-Methode auftreten, fallen bei der polarographischen Methode vollständig weg.

Zn: In sauren Elektrolyten liegen die Zinkstufen so negativ, daß sie von der Wasserstoffionen-Entladung überdeckt werden. In Tartratlösungen und in 0,1-n-KCl-Lösungen ist eine gleichzeitige Bestimmung von Zink neben Blei möglich.

Sn: Sn(IV), wie es im Laufe der Aufarbeitung erhalten wird, ist in den angegebenen Elektrolyten nicht zu Sn(II) reduzierbar, fällt also als störender Begleitstoff überhaupt aus. Die Reduktion ist nur in stark saurem Medium (6-n HCl) bzw. in NH_4Cl-Puffern möglich, oder es muß auf die Reduktionsstufe Sn(II) → Sn(0) oder die Oxydationsstufe Sn(II)→ Sn(IV) zurückgegriffen werden[36].

Tl: Die Bestimmung von Thallium neben Blei ist in alkalischen Elektrolyten bzw. in alkalischen Tartratlösungen möglich. Bezüglich einer gleichzeitigen Bestimmung von Blei neben Thallium sei auf die Arbeit von *E. Weinig*[37] verwiesen.

Polarographische Gefäße:

Für die Bestimmung von Mikrogrammengen Blei war es notwendig, in Elektrolysengefäßen mit getrennter Gegenelektrode zu arbeiten, da es sonst (hauptsächlichst durch Passivierung der Anoden) gleich zu Beginn der polarographischen Aufnahme zu Stromanstiegen kam. Damit wurde die Verwendung hoher Galvanometer-Empfindlichkeiten unmöglich gemacht und es kam zur Ausbildung von nur schlecht meßbaren Grundströmen.

Die Diaphragmengefäße von *G. Massen*[38] mit einem G-4-Filter von Schott und Gen. sind für exakteste Bestimmungen ungünstig, da ihre Filter nicht so dicht sind, daß ein Durchtritt von Lösungsmittel verhindert wird. Dichtere Fritten sind wegen des zu großen Widerstandes im Stromkreis nicht statthaft. Auch für die Verwendung kleinster Flüssig-

keitsmengen, wie sie für die Bestimmung kleinster Bleimengen verwendet werden müssen, sind die *Massens*chen Gefäße etwas zu plump.

Die namentlich für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Elektrodengefäße, wie z. B. die von *M. Kalousek*[39], *A. Langer*[40], *H. K. Beecher* und Mitarb.[41] und auch das Gefäß von *J. J. Lingane*[42] sind hingegen für Routinebestimmungen wieder zu kompliziert, vor allem aber schlecht zu reinigen. Für unsere Zwecke wurde deshalb ein einfaches Elektrolysengefäßchen konstruiert, das genügend dicht gegen die Gegenelektrode ist,

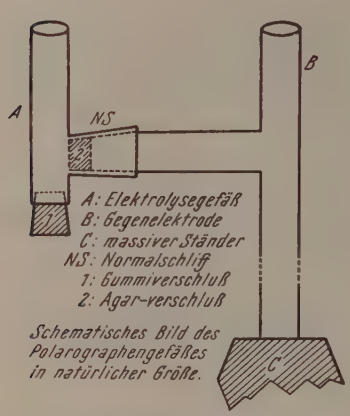


Abb. 4. Die Gaseinleitungskapillare, die durch den mit Quecksilber gedichteten Gummiverschluß 1 führt, wurde der größeren Deutlichkeit wegen weggelassen

die Verwendung kleiner Volumina ermöglicht und leicht zu reinigen ist (Abb. 4).

Das Gefäß besteht aus zwei Teilen: dem eigentlichen Elektrolysegefäß *A* und der Gegenelektrode *B*, die durch einen Normalschliff *NS* miteinander verbunden sind. Der Schliffkegel von *B* ist so in den Schliffmantel von *A* eingesetzt, daß seine Spitze mit der Innenwand von *A* abschließt. Die Spitze selbst ist durch einen Agarpfropf verschlossen, der den Übergang von Lösung zwischen Gegenelektrode und Elektrolysegefäß verhindert.

Nach Gebrauch ist der Teil *A* leicht von *B* abzuziehen und kann dann in der üblichen Weise durch Auskochen mit Salpetersäure gereinigt werden. Der Agarpfropfen in der Spitze des Schliffkegels von *B* wurde in gleicher Dicke (Widerstand) erhalten, indem er aus einem in einem großen Wägeglas erstarrten Agar-Gel ausgestochen wurde. Als Gegenelektrode dient eine gesättigte Kalomelelektrode. Agar-Gel: 3%ige Agargallerte mit 0,1-n KCl gequollen. Für die Verwendung größerer Elektrolytvolumina (bis zu 5 ml) wurde ein gleichgebautes Zusatzröhrchen verwendet, das auf den Normalschliff *NS* aufzusetzen ist.

Methoden zur Anreicherung von Blei für die polarographische Bestimmung

Für die Bestimmung von Mikrogrammengen Blei ist es meist notwendig, das Blei durch geeignete Methoden anzureichern. Falls dies durch einfaches Eindampfen möglich ist, kann die beliebig kleine Endlösung direkt polarographiert werden. Andernfalls (wie z. B. bei Untersuchungen von biologischem Material) wurden von uns folgende Anreicherungsmethoden verwendet:

1. *Mitfällung.*

Als allgemein geübte analytische Methode kann die Kenntnis dieser Anreicherungsform vorausgesetzt werden. So wird z. B. bei der Analyse von Harnen durch eine im essigsauren Milieu erzeugte Calciumoxalat-Fällung das Blei quantitativ erfaßt. Nach Verglühen des dekantierten und getrockneten Niederschlages wird dieser in Säuren gelöst und kann direkt polarographiert bzw. einer nochmaligen Reinigung (z. B. durch Dz) unterzogen werden.

2. *Anreicherung mit Dithizon.*

Das Blei wird mit Dz erschöpfend extrahiert, hierauf das Bleidithizonat ohne weitere Reinigung mit Säuren zersetzt, mit CCl_4 gewaschen (Dz-Entfernung) und auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Eingeengt bzw. eingedampft und mit einem beliebig gewählten Elektrolyten aufgenommen, ist die Lösung zur polarographischen Bestimmung bereit.

Diese namentlich für Präzisionsmessungen und Bestimmung kleinster Bleimengen ($\sim 0{,}1\ \mu g$) am besten zu empfehlende Methode liefert, da sie reine Bleiendlösungen ergibt, genauest einzuhaltende Elektrolyt-Normalitäten verbürgt und frei von Salzballast ist, die exaktesten Werte. Zum Abschluß seien kurz die Punkte zusammengestellt, die diese Ausführungsform der Bleibestimmung an Genauigkeit, Raschheit und Einfachheit von der reinen Dz-Bestimmung unterscheidet:

1. Größere Genauigkeit und erweiterte Nachweisgrenze durch Vermeidung der die Dz-Methode begrenzenden Verluste durch alkalische Waschflüssigkeiten;

2. Konstante Werte durch geringere Gefahr von Einschleppung oder Verlusten von Blei durch wesentlich weniger Reagenszusätze und Einzeloperationen.

3. Einsparung von Zeit, Arbeit und Kosten durch Wegfall von speziell zu reinigenden Analysenchemikalien.

4. Vermeidung von Vorextraktionen für die Entfernung von Wismut. Polarographische Bestimmung einzelner Metallionen nebeneinander.

Die in der Literatur[43—45] beschriebenen Methoden der elektrolyti-

schen Bleianreicherung konnten von uns wegen apparativer Schwierigkeiten nicht erprobt werden.

Versuche mit organischen Austauschern verliefen leider negativ, da trotz weitestgehender Variierung von Waschwassermenge, Filtergeschwindigkeit und Säurekonzentration 50 μg Blei z. B. nicht mehr quantitativ aus der Säule ausgewaschen werden konnten.

Die polarographische Bestimmung von Blei neben dreiwertigem Eisen

Eine direkte polarographische Bestimmung von Blei in Lösungen, die Eisen(III) enthalten, ist nur in komplexbildenden Grundelektrolyten bei $p_H > 7$ günstig, da die Fe(III)/Fe(II)-Stufe so weit positiv liegt, daß die Polarogramme sofort mit dem Anstieg der Eisenstufe beginnen. Damit tritt der Fall ein, daß die Bleistufen auf den hohen Eisen-Vorstufen aufsitzen und durch eine Erhöhung der Galvanometerempfindlichkeit nicht genügend vergrößert werden können, da die Vorstufen im gleichen Maße vergrößert werden und damit sehr oft der Ausschlagbereich des Spiegel-Galvanometers überschritten wird.

In den komplexbildenden Grundelektrolyten Citrat und Tartrat ist die Fe(III)/Fe(II)-Stufe verschoben. Ihre Halbstufenpotentiale betragen nach *J. J. Lingane*[46] in

0,5-m Citrat p_H 4: −0,04 V
0,5-m Citrat p_H 7: −0,37 V
0,5-m Citrat p_H 10: −0,90 V
0,5-m NH_4-Tartrat + 1-n NH_3: −1,00 V.

In sauren Tartratlösungen treten die gleichen Stufen wie in sauren Citratlösungen auf. In neutralen Tartratlösungen treten zwei Stufen auf, die auf ein gehemmtes Gleichgewicht zwischen den sauren und neutralen Tartratkomplexen zurückzuführen sind[47] und deren komplizierte p_H-Abhängigkeiten den Elektrolyten für Serienbestimmungen wenig tauglich machen. In alkalischen Tartratlösungen ist die Fe(III)/Fe(II)-Stufe wieder gut ausgebildet[48] und negativer als die Bleistufe. Für die exakte Bestimmung von geringen Mengen Blei neben Eisen(III) ist es also notwendig, entweder

1. in komplexbildenden Grundelektrolyten (Citrat, Tartrat, Oxalat usw.) bei alkalischen p_H-Werten zu arbeiten, oder

2. durch eine Reduktion des Fe(III) zu Fe(II) den störenden Einfluß der Fe(III)/Fe(II)-Stufe zu unterdrücken. Die Reduktionsstufe Fe(II)/Fe(0) hat ein Halbstufenpotential, das größer ist als −1,0 V, und stört daher in keiner Weise die Bleibestimmung.

Nach *J. Teisinger*[49] werden zur polarographischen Bestimmung von

Blei neben Fe(III) saure Citratlösungen als Grundelektrolyte verwendet, während *E. Forche*[50] eine Methode mit Verwendung alkalischer Leitelektrolyte angibt. Bei der nach *Forche* verwendeten stark alkalischen Tartratlösung liegt die Fe(III)/Fe(II)-Stufe negativer als die Bleistufe, so daß Störungen der beschriebenen Art wegfallen.

Trotz dieser sorgfältig ausgearbeiteten Bestimmungsmethode erschien es uns jedoch bald wünschenswert, eine etwas rascher arbeitende Methode zu haben, um die langwierigen Extraktionszeiten mit Tartratlösungen womöglich zu vermeiden, die schlecht zu reinigenden und schlecht aufzubewahrenden starken NaOH-Lösungen entbehrlich zu machen und um vor allem zu günstigeren Endlösungen zu gelangen, als es alkalische Elektrolyte sind, in denen schlecht zu vermessende, gedehnte Stufen (großer Raumbedarf) entstehen. Zu diesem Zweck sollte der störende Einfluß des Fe(III) durch eine Reduktion zu Fe(II) ausgeschaltet werden. Außerdem leitete uns auch die Absicht, in sauren Grundelektrolyten mit ihren schon beschriebenen Vorteilen arbeiten zu können. Als Reduktionsmitteln wurde Hydroxylamin-Chlorhydrat erprobt.

Die Bestimmung von Pb neben Fe(III) nach vorangehender Reduktion des Fe(III) zu Fe(II) mit $NH_2OH \cdot HCl$

R. Strubl beschreibt[51] die Verwendung von Hydroxylamin zur Reduktion der störenden Fe(III)-Ionen bei der Analyse von Uranerzen und eisenhaltigen Zinkblenden. *G. Thannheiser* und *G. Maassen* berichten[52], daß sie bei der Analyse von Stählen weder mit Hydroxylamin (nach der *Strubl*'schen Methode) noch mit anderen Reduktionsmitteln Erfolge erzielen konnten. Trotz dieser widersprechenden Angaben wurde der Versuch unternommen, diese bei der Erzanalyse mit wechselndem Erfolg verwendete Methode in die Mikroanalyse zu übertragen, um sie für die polarographische Bleibestimmung verwenden zu können.

Eisen(III)-Lösungen mit Zusätzen von Blei:

In 500 ml doppelt dest. 20%iger HCl wurden 940 mg reinsten Eisendrahtes gelöst. 10 ml dieser Lösung wurden eingedampft und der Rückstand mit 0,1-n HCl, die verschiedene Bleimengen enthielt, aufgenommen. 10 ml dieser Lösung wurden zuerst direkt und dann im reduzierten Zustand polarographiert. Zur Reduktion wurden 10 ml der salzsauren, bleihältigen Eisenlösung am Wasserbad zur Trockene verdampft, der Rückstand in 20%iger $NH_2OH \cdot HCl$-Lösung, die 0,1-n an HCl war, gelöst, in einen 10-ml-Meßkolben übergeführt und 10 Minuten auf dem lebhaft siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit der Reduktionslösung bis zur Marke aufgefüllt.

In Abb. 5 wird die Wirkungsweise der Reduktionsmethode an Hand von Polarogrammen, die die Erniedrigung bzw. den Ausfall der Fe(III)-

Stufe zeigen, dargestellt. Verwendet wurden Eisen(III)-Lösungen, die 20 μg Blei enthielten.

Da das Redoxpotential Fe(III)/Fe(II) bei Abwesenheit von Komplexbildern bei + 0,47 V (also im Bereich der anodischen Auflösung des Quecksilbers) liegt, erhält man keinen Grundstromwert mehr und die Kurve steigt zu Beginn des Polarogramms sofort an.

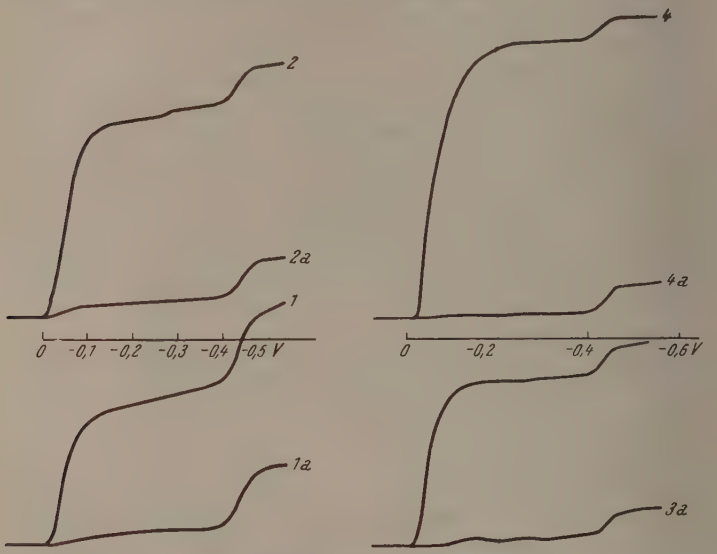


Abb. 5. Polarogramme von nicht reduzierten (1—4) und reduzierten (1a—4a) Eisen (III)-Lösungen verschiedener Konzentration, die 20 µg Blei enthalten

Kurve	mg% Fe^{3+}	µg Pb	Reduziert	Galv.-Empfindlichkeit
1	18,8	20	nein	$E/_{20}$
1a			ja	
2	37,6	20	nein	$E/_{20}$
2a			ja	
3	56,4	20	nein	$E/_{50}$
3a			ja	
4	94,0	20	nein	$E/_{50}$
4a			ja	

Reduktionsmittel: $NH_2OH \cdot HCl$ 20%.
Säurekonzentration: 0,1-n HCl.
Erhitzt: 10 Minuten.
Getrennte Elektroden.
Markierung der Galv.-Nullinie.

Reduktionswirkung von verschiedenprozentigen Hydroxylamin-Chlorhydrat-Lösungen

In Abb. 6 werden die Meßergebnisse von Lösungen gezeigt, die 94 mg Fe(III) enthielten und mit $NH_2OH \cdot HCl$ verschiedener Konzentration reduziert wurden. Die gewählte Eisenmenge entspricht ungefähr

dem fünffachen Eisengehalt von 10 ml Blut, die üblicherweise zur Bleibestimmung verwendet werden.

Autoxydation von reduzierten Eisenlösungen an der Luft

Eine wichtige Frage bei Anwendung der Reduktionsmethoden ist die nach der Beständigkeit der reduzierten Lösungen. Zu deren Beurteilung wurden folgende Versuche unternommen:

10 ml einer reduzierten, 94 mg Fe enthaltenden Lösung wurden in verschiedenen Zeitabständen in Stickstoffatmosphäre polarographiert. Diese in der Polarographie übliche Methode, die vorher entlüftete Lösung durch eine N_2-Atmosphäre vor einer Wiederaufnahme von O_2 zu schützen, dient in diesem Falle gleichzeitig dem Zweck, eine Oxydation des Fe(II) durch den Luftsauerstoff soweit als möglich hintanzuhalten.

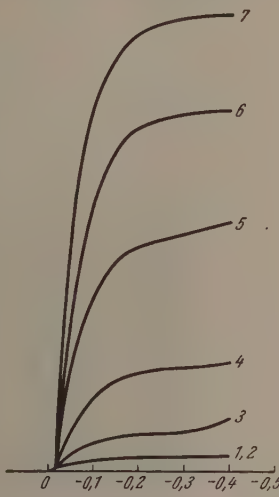


Abb. 6. Reduktionswirkung von $NH_2OH \cdot HCl$-Lösungen verschiedener Konzentration auf eine konstante Eisenmenge von 94 mg Fe (III)

Die Abb. 7 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche, die einmal im offenen Gefäß (Abb. 7*a*) und einmal im geschlossenen (Abb. 7*b*) durchgeführt wurden. Obwohl die Ergebnisse — wie nicht anders zu erwarten — in den geschlossenen Gefäßen besser waren, sieht man, daß ohne weiteres auch offene Gefäße geeignet sind, da die erste Eisenstufe erst nach ca. 1 Stunde wieder auftritt.

Kurve	Reduktionsmittel	Galv.-Empfindlichkeit
1	20% $NH_2OH \cdot HCl$	$E/_{30}$
2	15% „	$E/_{30}$
3	12% „	$E/_{30}$
4	10% „	$E/_{30}$
5	8% „	$E/_{30}$
6	5% „	$E/_{30}$
7	nicht reduziert	$E/_{30}$

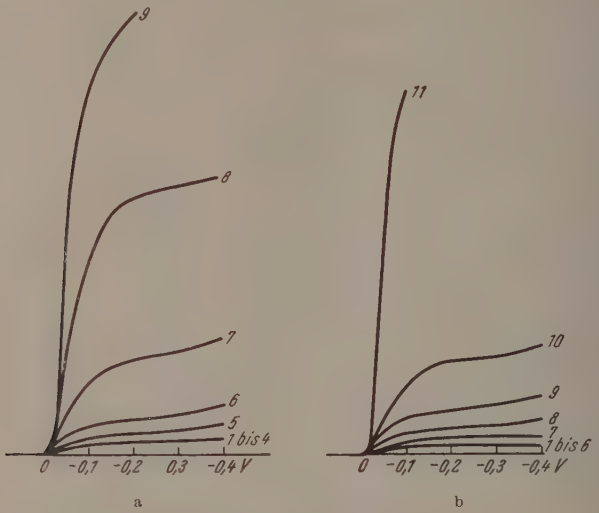
Säurekonzentration: 0,1-n HCl.
Erhitzt: 10 Minuten.
Konstanter Eisenwert: 94 mg Fe^{3+}.
Getrennte Elektroden.
Markierung der Galv.-Nullinie.

Die Reduktion des dreiwertigen Eisens in Mengen bis zu ca. 100 mg läßt sich mit 20%iger $NH_2OH \cdot HCl$-Lösung durch 10 Minuten langes Erhitzen auf dem lebhaft siedenden Wasserbad zufriedenstellend durchführen. Im Anschluß daran kann Blei ohne Störung durch dreiwertiges Eisen polarographisch bestimmt werden.

Die quantitative Auswertung der Polarogramme

Bei Eichaufnahmen müssen gleiche Tropfzeiten der Kapillare, gleiche Niveauhöhe des Quecksilbers, gleiche Elektrolytzusammensetzung und gleiche Temperatur eingehalten werden.

Abb. 8 zeigt eine mit reinen Bleilösungen ermittelte Eichgerade; die Tabelle gibt die dazugehörigen Werte mit den einzelnen Genauigkeitsgrenzen an. Das Meßvolumen war 2 ml, der Elektrolyt 0,1-n HCl + 0,01% Gelatine;



a b

Abb. 7. Autoxydation von reduzierten Eisenlösungen an der Luft

Kurve	Polarographiert nach
1	sofort
2	10 Minuten
3	20 ,,
4	30 ,,
5	60 ,,
6	2 Stunden
7	3 ,,
8	5 ,,
9	10 ,,

Polarographiert im offenen Gefäß unter Stickstoffatmosphäre.
Säurekonzentration: 0,1-n HCl.
Konstanter Eisenwert: 94 mg Fe^{3+}
Empfindlichkeit: $E/_{30}$'
Getrennte Elektroden.
Markierung der Galv.-Nullinie.

Kurve	Polarographiert nach
1	sofort
2	10 Minuten
3	20 ,,
4	30 ,,
5	60 ,,
6	2 Stunden
7	4 ,,
8	6 ,,
9	10 ,,
10	20 ,,
11	30 ,,

Polarographiert im geschlossenen Gefäß unter Stickstoffatmosphäre.
Säurekonzentration: 0,1-n HCl.
Konstanter Eisenwert: 94 mg Fe^{3+}.
Empfindlichkeit: $E/_{30}$'
Getrennte Elektroden.
Markierung der Galv.-Nullinie.

berechnet wurde die Gerade auf eine Empfindlichkeit von 1/10. Der Maßstab der Koordinaten wurde so gewählt, daß er der erreichbaren Meßgenauigkeit entsprach. Die Mittelwerte wurden aus fünf Einzelwerten errechnet. Um sich ein Bild über die unter ungünstigsten Bedingungen erhaltenen größten Abweichungen (Maximalfehler) zu machen, wurden in der Tabelle zu Abb. 8 die Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert in größte und mittlere unterteilt.

Die Grenze der Leistungsfähigkeit der polarographischen Methode

ist mit den in Abb. 8 gegebenen Werten keinesfalls schon erreicht. Bei höchster Galvanometerempfindlichkeit würden z. B. die Abszissen-

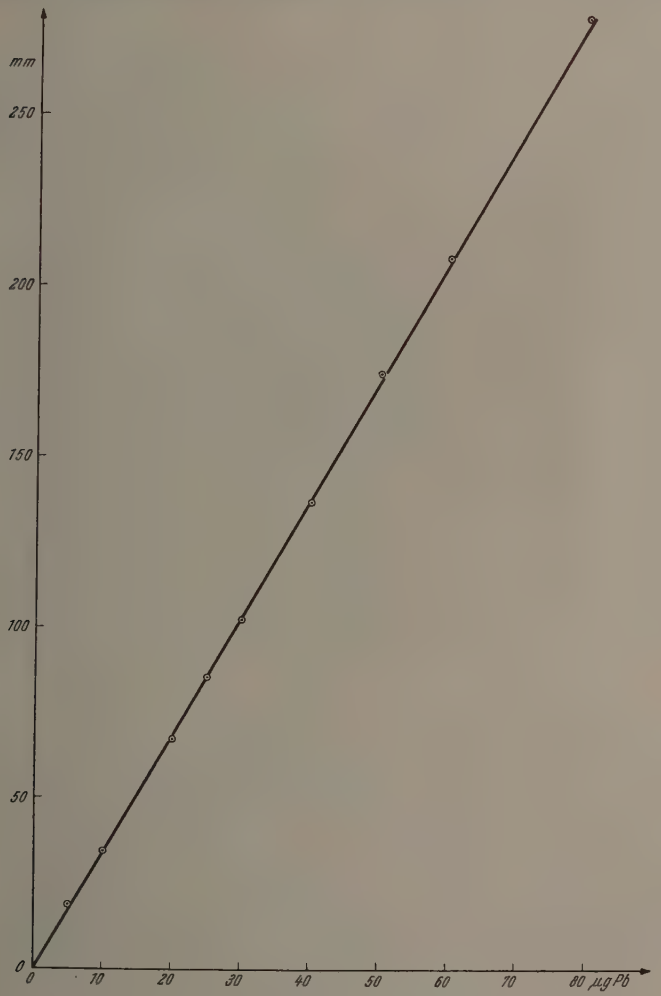


Abb. 8 (siehe auch Tabelle)

werte um eine Zehnerpotenz verkleinert. Die Gerade gilt dann für Werte zwischen 0,5 und 8 µg. Die Abweichungen bleiben gleich. Eine Verminderung des Meßvolumens von 2 auf 0,2 ml steigert die Genauigkeit

um eine weitere Zehnerpotenz. Damit ist die größenordnungsmäßige Bestimmung von 0,05 μg Blei möglich. Es sei jedoch vor übertriebenen Genauigkeitsansprüchen in diesem Konzentrationsbereich gewarnt. Wenn

Zu Abb. 8

Pb μg	Stufenhöhe in mm		Empfindlichkeit E	Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert						Stufenhöhe berechnet für $E/_{10}$
	Einzelwert	Mittelwert		Größte			Mittlere			
				mm	μg Pb	%	mm	μg Pb	%	
5	20,0 16,3 17,5	20,3 19,0	18,6	$^1/_{10}$	2,3	0,62	12,4	1,4	0,37	7,4	18,6
10	36,0 35,0 33,8	33,7 33,4	34,4	$^1/_{10}$	1,6	0,47	4,7	0,9	0,25	2,5	34,4
20	66,7 68,3 70,0	66,0 67,3 68,5	67,8	$^1/_{10}$	2,2	0,65	3,3	1,1	0,33	1,7	67,8
25	84,6 83,8 87,0	87,3 85,7	85,7	$^1/_{10}$	1,9	0,55	1,8	1,2	0,34	1,5	85,7
30	53,3 51,3 51,5	50,0 51,2 51,5	51,3	$^1/_{30}$	2,0	0,58	1,9	0,6	0,19	0,6	102,7
40	69,3 67,2 70,5	68,0 67,2	68,5	$^1/_{30}$	2,0	0,58	1,5	1,1	0,33	0,8	137,0
50	87,7 88,0 89,7	86,5 85,6	87,4	$^1/_{30}$	2,4	0,68	1,4	1,3	0,37	0,7	174,8
60	71,4 71,0 68,7	68,8 67,6	69,5	$^1/_{30}$	1,9	0,54	0,9	1,4	0,39	0,7	208,5
80	55,7 56,3 54,0	57,0	55,8	$^1/_{50}$	1,8	0,50	0,6	0,9	0,26	0,3	278,8

es auch möglich ist, sogar in einem Volumen von 0,005 ml zu polarographieren[53], darf man sich doch über die so erreichbare Genauigkeit keine Illusionen machen: die Anforderungen an die Konstanz der Kapillarencharakteristik allein dürften z. B. dann kaum mehr zu verwirklichen sein. Daher dürfte auch die Angabe einer Meßgrenze von 0,0001 μg Blei durch *J. Heyrovský*[26] mehr als ein theoretischer Grenzfall aufzufassen sein. Das Arbeiten mit kleinem Volumen, das genaue Einregulieren der Kompensationsströme, die minutiöse Anforderungen an die Gleichmäßigkeit von Tropfzeit und Tropfengröße der Kapillare und die genaueste Messung der Restströme erfordern bereits einen bedeutend größeren Aufwand bei Analysen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1 μg als in höheren Konzentrationsbereichen. Als praktische Meßgrenze dürfte daher ein Wert von 0,05 μg Blei anzugeben sein. Für Serienbestimmungen, die einfach und rasch durchzuführen sind, genügen fast immer Grenzwerte von 1 μg.

Bestimmung des Bleigehaltes durch Eichzusätze

Durch Zusätze bekannter Mengen eines Depolarisators ist es möglich, auch ohne Eichgerade den Bleigehalt zu bestimmen. Bezüglich der Wahl eines Depolarisators bestehen verschiedene Möglichkeiten.

Die auf Blei zu untersuchende Lösung wird polarographiert, hernach die Konzentration durch Zusatz einer bekannten Bleimenge erhöht und nochmals polarographiert. Aus der Differenz der beiden Stufenhöhen kann die unbekannte Bleikonzentration errechnet werden. Der praktische Vorteil dieser Methode liegt darin, daß damit die Versuchsbedingungen bei der Analysen- und Vergleichsprobe gleichzuhalten sind. Der Eichzusatz wird auf Grund des ersten Polarogrammes so bemessen, daß die Stufenhöhe ungefähr verdoppelt wird. Die Genauigkeit einer Reihe von Eichaufnahmen in der früher beschriebenen Art wird allerdings nicht erreicht und der Zeitaufwand für eine Analyse wird durch Unterbrechen des Polarogrammes, Pipettieren, neuerliches Entlüften und Polarographieren annähernd verdoppelt.

An Stelle eines Eichzusatzes gleichartiger Ionen in bekannter Konzentration kann der Untersuchungslösung auch ein anderer Depolarisator mit benachbart liegendem Halbstufenpotential zugesetzt werden. Diese Methode, die den Leitelement-Zusätzen in der Spektralanalyse ähnelt, wurde von *E. Forche*[54] in die Polarographie eingeführt.

Durch deren Anwendung werden die Eichgeraden von eventuellen Unterschieden in der Zusammensetzung der Untersuchungslösung unabhängig.

Außer den angegebenen Arbeiten *E. Forches* findet man nur in der amerikanischen Literatur[55] eine Erwähnung des Stufenquotienten zur Bestimmung von Blei in biologischem Material, leider aber mit zu wenig detaillierten Angaben. Daher werden Eichgerade unter Verwendung des Stufenquotienten für die Bestimmung des Bleis in kleinen Konzentrationen gezeigt.

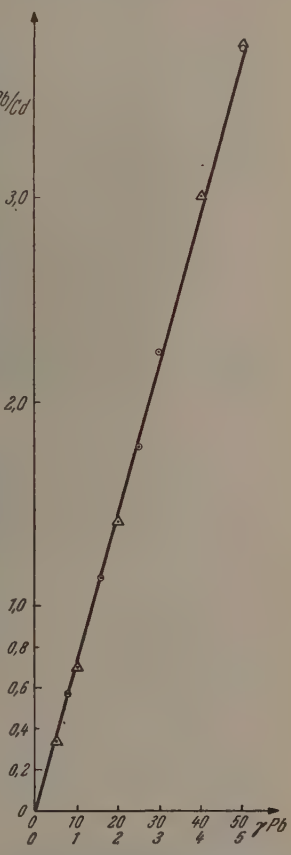


Abb. 9. Stufenquotient-Eichgerade für Bleimengen zwischen 10 und 50 bzw. 0,5 und 5,0 μg (siehe auch Tabellen)

Die Gerade (Abb. 9, Meßpunkte ⊙) für Bleiwerte von 8 bis 50 μg wurde unter folgenden Bedingungen erhalten:

Zu Abb. 9

Meßpunkte: ⊙

µgPb	E	Pb	Cd	Pb:Cd		Mittlerer Fehler	
				Einzelwert	Mittelwert	µg	%
8	1/10	28,0 27,0 25,4	49,0 46,9 46,1	$0{,}57_8$ $0{,}57_6$ $0{,}55_1$	0,57	0,16	1,8
16	1/10	54,7 54,0 58,0	47,8 48,2 49,9	1,14 1,12 1,16	1,14	0,21	1,3
25	1/10	75,8 79,0 79,3	44,0 44,0 43,8	1,72 1,80 1,81	1,78	0,54	2,2
30	1/20	49,3 46,0 46,5	21,9 20,0 21,1	2,25 2,30 2,20	2,25	0,44	1,5
50	1/20	74,2 81,0 83,8	20,0 21,5 22,7	3,72 3,77 3,69	3,73	0,40	0,8

Meßpunkte: △

µgPb	E	Pb	Cd	Pb:Cd		Mittlerer Fehler	
				Einzelwert	Mittelwert	µg	%
0,5	1/1	16,0 14,5 13,4	45,0 42,3 43,0	$0{,}35_6$ $0{,}34_3$ $0{,}31_2$	0,34	0,03	5,0
1,0	1/1	31,4 31,5 34,2	45,3 43,8 48,0	$0{,}67_8$ $0{,}72_0$ $0{,}71_2$	0,70	0,02	2,4
2,0	1/1	62,4 60,8 63,6	44,6 43,4 43,9	1,40 1,40 1,45	1,42	0,03	1,7
4,0	½	67,6 65,4 60,2	22,4 21,5 20,4	3,02 3,04 2,96	3,01	0,04	1,0
5,0	½	78,8 72,8 81,2	21,2 19,2 21,9	3,72 3,79 3,71	3,74	0,04	0,9

Meßvolumen: 2 ml.
Elektrolyt: 0,1-n HCl + 0,01% Gelatine.
Konst. Cd-Zusatz: 10 µg.
Max. Galv.-Empfindlichkeit: 1/10.

Bei Vergrößerung der Galvanometer-Empfindlichkeit von 1/10 auf 1/1 und gleichzeitiger Verkleinerung des konstanten Cadmiumzusatzes von 10 auf 1 µg, erhält man dieselbe Gerade für Bleiwerte zwischen 0,5 und 5 µg (Abb. 9, Meßpunkte △).

Zusammenfassung

Es werden die Angaben für eine exakte Bestimmung von Mikrogrammmengen Blei mittels Dithizon und die Reproduzierbarkeit der kolorimetrischen Einfarbenmethode überprüft. Die verschiedenen pH-Abhängigkeiten,

die im Laufe der Dithizonmethode von Bedeutung sind, werden experimentell festgelegt. Weiters wird die Bestimmung von Mikrogrammengen Blei auf polarographischem Wege diskutiert und insbesondere eine einfache Methode zur Bestimmung von Blei neben Eisen(III) angegeben.

Summary

A check was made of the statements regarding the accurate determination of microgram quantities of lead by means of dithizone and also of the reproducibility of the colorimetric one-color method. The various p_H relationships, which are of significance during the course of the dithizone procedure, were established experimentally. In addition, the determination of microgram quantities of lead polarographically was discussed and in particular a simple method was given for the determination of lead in the presence of iron(III).

Résumé

On a contrôlé les conditions d'un dosage exact du plomb par la dithizone, à l'échelle du microgramme ainsi que la reproductibilité de la méthode colorimétrique à une couleur.

On a établi expérimentalement les différentes influences du p_H qui se manifestent au cours du processus du dosage par la dithizone. On discute en outre le dosage polarographique du plomb à l'échelle du microgramme et l'on décrit en particulier, une méthode simple de dosage du plomb en présence de fer(III).

Diskussion

H. *M. Oosting* (Delft): Sie haben uns gezeigt, daß bei p_H 4 noch kein Blei extrahiert wurde; wir haben gefunden, daß Blei bei p_H 4 mit Dithizon etwas extrahiert wurde, nur war das nicht mit Tetrachlorkohlenstoff, sondern mit Chloroform. Haben Sie auch so etwas beobachtet?

H. *P. Schweda:* In Chloroform ist die Löslichkeit des Bleidithizonats größer; es wäre also prinzipiell möglich, daß Spuren von Blei schon bei einem tieferen p_H extrahiert werden. Es würde mich aber interessieren, wie Sie das dann identifiziert haben. Sie extrahieren also das Blei bei p_H 4 mit Dithizon und verwenden dann wahrscheinlich die Mischfarbenmethode.

H. *M. Oosting:* Nein, wir haben es nur qualitativ nachgewiesen, spektrographisch; es interessierte mich nur zu wissen, ob überhaupt Blei bei diesem p_H extrahiert wird.

H. *P. Schweda:* Wir finden, wie Sie gesehen haben, kein Blei bei diesem p_H, auch nicht polarographisch.

Literatur

[1] *E. Fischer*, Ann. Chem. **190**, 181 (1877/78).

[2] *H. Fischer*, Wiss. Veröff. Siemens-Werke **4**, 167 (1926). **6**, 147 (1928); **10**, 99 (1931);

[3] *H. Fischer*, Z. angew. Chem. **42**, 1025 (1929).

[4] *H. Fischer*, Z. angew. Chem. **47**, 685 (1934).

[5] *H. Fischer* und *G. Leopoldi*, Z. angew. Chem. **47**, 90 (1934); Wiss. Veröff. Siemens-Werke **12**, 44 (1933).

[6] *P. L. Hibbard*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **10**, 179 (1938).

[7] *H. Fischer* und *G. Leopoldi*, Z. analyt. Chem. **119**, 161 (1946).

[8] *H. Fischer, M. Passer* und *G. Leopoldi*, Mikrochem. **30**, 324 (1940).
[9] *H. Taeger*, Ergebnisse d. inn. Med. **54**, 459 (1938).
[10] *B. Behrens* und *H. Taeger*, Z. ges. exp. Medizin **96**, 582 (1935).
[11] *S. L. Tompsett* und *A. B. Anderson*, Biochemic. J. **29**, 1851 (1935).
[12] *E. S. Wilkins, G. J. Willoughby, E. O. Kramer* und *F. L. Smyth*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **7**, 33, 285 (1935).
[13] *F. L. Kozelka* und *E. F. Kluchesky*, ind. Eng. Chem. Analyt. Ed. **13**, 492 (1941).
[14] *P. A. Clifford*, J. Assoc. Off. Agric. Chemists **26**, 26 (1943).
[15] *K. Bambach* und *R. E. Burkey*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 904, 275 (1942).
[16] *J. Schultz* und *M. A. Goldberg*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **15**, 155 (1943).
[17] *D. M. Hobbard*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **9**, 493 (1937).
[18] *L. F. Bielefeld* und *T. M. Patrik*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 275 (1942).
[19] *J. Cholak* und *D. M. Hubbard*, Analyt. Chemistry **20**, 671 (1948).
[20] *H. Fischer* und *G. Leopoldi*, Metall u. Erz **35**, 86 (1938).
[21] *H. Fischer* und *G. Leopoldi*, Z. analyt. Chem. **107**, 241 (1936).
[22] *H. Fischer*, Angew. Chem. **50**, 919 (1937).
[23] *H. Fischer* und *G. Leopoldi*, Chem.-Ztg. **49/50**, 231 (1940).
[24] *H. Müller*, Z. analyt. Chem. **113**, 161 (1938).
[25] *O. B. Winter, H. M. Robinson, F. W. Lamb* und *E. J. Müller*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **7**, 265 (1935).
[26] *J. Heyrovský*, Polarographie. Wien: J. Springer. 1941.
[27] *M. v. Stackelberg*, Polarographische Arbeitsmethoden. Berlin: de Gruyter. 1950.
[28] *I. M. Kolthoff* und *J. J. Lingane*, Polarography. New York: 1941.
[29] *H. Hohn*, Chemische Analysen mit dem Polarographen. Berlin: J. Springer. 1937.
[30] *I. M. Kolthoff*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 195 (1942).
[31] *J. J. Lingane*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **16**, 329 (1944).
[32] *J. K. Taylor*, Analyt. Chemistry **22**, 495 (1950).
[33] *F. L. English*, Analyt. Chemistry **20**,889 (1948).
[34] *D. Ilkovič* und *G. Semerano*, Coll. trav. chim. Tchécoslovaquie **4**, 176 (1932).
[35] *J. J. Lingane* und *H. Kerlinger*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 750 (1940).
[36] *V. Majer*, Coll. trav. chim. Tchécoslovaquie **9**, 360 (1937).
[37] *E. Weinig*, Dtsch. Z. ges. gerichtl. Medizin **38**, 199 (1944).
[38] *G. Massen*, Angew. Chem. **50**, 375 (1937).
[39] *J. Heyrovský* und *M. Kalousek*, Coll. trav. chim. Tchécoslovaquie **11**, 464 (1939).
[40] *A. Langer*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **17**, 454 (1945).
[41] *H. K. Beecher, R. Follansbee, A. J. Murphy* und *F. N. Craig*, J. Biol. Chem. **146**, 197 (1942).
[42] *J. J. Lingane*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **16**, 329 (1944).
[43] *J. J. Lingane*, J. Amer. Chem. Soc. **67**, 1916 (1945).
[44] *K. Bambach* und *J. Cholak*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **13**, 504, 583 (1941).
[45] *K. Bambach*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **11**, 400 (1939).
[46] *J. J. Lingane*, J. Amer. Chem. Soc. **68**, 2448 (1946).
[47] *A. Richter*, Angew. Chem. **52**, 679 (1939).

[48] *E. T. Verdies*, Coll. trav. chim. Tchécoslovaquie **11**, 233 (1939).
[49] *J. Teisinger*, Z. ges. exp. Medizin **98**, 520 (1936).
[50] *E. Forche*, Dissertation. Leipzig: 1938.
[51] *R. Strubl*, Coll. trav. chim. Tchécoslovaquie **10**, 466 (1938).
[52] *G. Thannheiser* und *G. Massen*, Arch. Eisenhüttenwes. **10**, 441 (1937).
[53] *V. Majer*, Mikrochem. **18**, 74 (1935).
[54] *E. Forche*, Mikrochem. **25**, 217 (1938).
[55] *J. Cholak* und *K. Bambach*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **13**, 58 (1941).

Aus dem Analytischen Laboratorium der Treibacher Chemischen Werke A.-G., Treibach, Kärnten

Eine photometrische Bestimmung des Samariums in Ceriterdengemischen

Von

Robert Rasin-Streden, Walter Dauschan und **Otto Zemek**

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 15. April 1955)

Die Gruppe der Ceriterden umfaßt nach elektronentheoretischen Überlegungen die Elemente der Ordnungszahlen 57 bis 64, reicht also von La bis Gd. Nach der älteren Auffassung wurden Eu und Gd noch zu den Yttererden gezählt, da sie in den typischen Ceritmineralien kaum anzutreffen sind. Der Monazit, als wichtigstes Ceritmineral, enthält von dieser Gruppe die Glieder La, Ce, Pr, Nd und Sm, die sowohl gemeinsam als auch in einigen Einzelgliedern bedeutendes technisches Interesse erlangt haben. Dabei werden die Reinheitsanforderungen, die an die Einzelglieder gestellt werden, ständig hinaufgesetzt.

Dementsprechend ergibt sich die Notwendigkeit einer ausreichenden analytischen Kontrolle der Ausgangs-, Zwischen- und Endprodukte. Die Schwierigkeiten, die sich dieser Aufgabe wegen der überaus großen chemischen Ähnlichkeit der einzelnen Glieder entgegenstellen, sind bekannt. Immerhin lassen sich Ce und Eu durch Überführung in andere Oxydationsstufen recht genau bestimmen, während für das Samarium eine präparative Abtrennung durch Amalgamreduktion von *Brukl*[1] angegeben wurde. Sieht man von den emissionsspektralanalytischen und röntgenspektroskopischen Methoden, die umfangreiche Apparaturen und Eicharbeiten erfordern, ab, so bleiben für die Bestimmung von Pr, Nd und Sm nur die Methoden der Absorptionsspektralanalyse, während für die Bestimmung des Lanthans, das kein Absorptionsspektrum besitzt, nur die indirekte Berechnung aus Gesamtoxyd minus Summe der bestimmbaren Oxyde möglich ist.

Unter Verwendung spektralphotometrischer Verfahren, die mit Mono-

chromatoren kleiner Bandbreite und photoelektrischer Registrierung arbeiten, gelang *C. J. Rodden*[2] und in neuerer Zeit *Moeller* und *Brantley*[3] die photometrische Bestimmung der sogenannten „bunten" Erden. Wie einer von uns bereits 1944 zeigen konnte, gelingt die photometrische Bestimmung von Pr und Nd auch mit Hilfe des Pulfrich-Photometers[4].

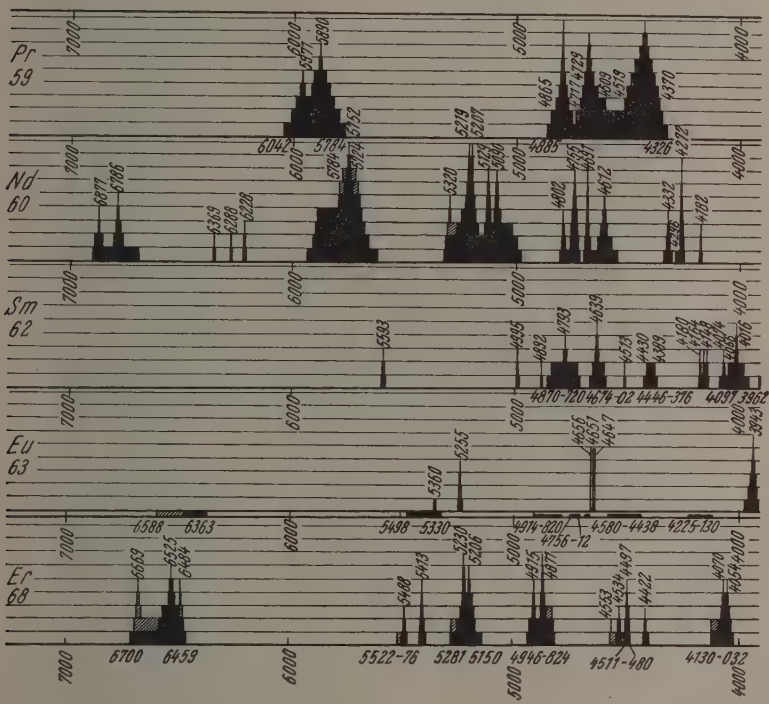


Abb. 1. Ausschnitt aus der bekannten Tabelle von *Prandtl* und *Scheiner*[5], bei der die Bandenintensitäten der Chloridlösungen, gemessen in 5-cm-Schicht, gegen die Wellenlängen aufgetragen sind. Unten sind stets die Stammlösungen mit 1 g-Atom/l eingetragen, darüber die Verdünnungen auf ½, ¼, ⅛ usw.

Wir hatten uns nun die Aufgabe gestellt, eine Sm-Bestimmung ebenfalls unter Verwendung des Pulfrich-Photometers auszuarbeiten, um dadurch nicht nur die direkte Bestimmung des Sm, sondern damit auch die indirekte Berechnung des La in den Erdgemischen zu ermöglichen. Das Absorptionsspektrum des Sm ist zwar wesentlich schwächer als jenes des Pr und Nd, gestattet aber immerhin noch den Nachweis von ca. 1 g Sm_2O_3 im Liter Chloridlösung, gemessen in 5 cm Schichtdicke.

Die Abb. 1 zeigt, daß von den drei Hauptbandengruppen des Sm die beiden längerwelligen wegen Koinzidenz mit starken Pr- und Nd-Banden

für eine Bestimmung unbrauchbar sind, während die Bandengruppe mit Spitze bei 4016 Å nur durch eine Er-Bande gestört wird. Auch sehr hohe Eu-Konzentrationen könnten allenfalls stören. Jedoch treten diese beiden Elemente in den Ceriterden in der Regel nicht oder zumindest nicht in störenden Konzentrationen auf.

Bei Verwendung der erwähnten Bandengruppe mit Spitze bei 4016 Å gelingt die Messung mittels der monochromatischen Strahlung der Hg-Linie 4047 Å als Meßlicht (HQE 41-Birne mit Filter Hg Cd 405 als Sperrfilter), was allerdings einige Schwierigkeiten mit sich bringt:

1. Bande und Hg-Linie liegen am violetten Ende des sichtbaren Spektrums und sind daher mit dem Auge nur schwer wahrzunehmen. Aus diesem Grunde ist das Gesichtsfeld im Photometer sehr dunkel und die Messung dementsprechend anstrengend. Auf jeden Fall muß man ein schwarzes Lichtschutztuch verwenden und die UV-Schutzgläser der Photometerlampe entfernen. Sehr vorteilhaft wäre hier die Verwendung eines lichtelektrischen Photometers (z. B. Elko II von Zeiss), falls ein entsprechendes Sperrfilter zur Verfügung steht.

2. Bandenschwerpunkt und Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes fallen nicht zusammen. Es ist deshalb keine Gültigkeit des *Beer*schen Gesetzes zu erwarten, da die Bande bei abnehmender Konzentration schwächer wird und gleichzeitig aus dem Bereich der Wellenlänge der monochromatischen Strahlung auswandert.

3. Selbst geringste Trübungen in der Meßlösung bewirken Streulichtbildung, deren Intensität mit abnehmender Wellenlänge zunimmt und bei dem verwendeten Violettfilter bedeutend werden kann. Absolut blanke Meßlösungen sind daher Voraussetzung für das Gelingen der Messung.

4. Die stets vorhandenen sehr geringen Eisen(III)-Mengen bewirken eine kontinuierlich ansteigende Extinktion im blauen und violetten Teil des Spektrums. Dieser Punkt, der die Hauptschwierigkeit bei der Ausarbeitung der Methode bildete, muß etwas genauer behandelt werden:

Die Abb. 2 zeigt die Farbkurve einer Eisen(III)-Lösung in 2-n Salzsäure, gemessen in 5-cm-Schicht. Als Abszisse ist die Wellenlänge mit den Filterschwerpunkten der Spektralfilter aufgetragen, während die Ordinaten die gemessenen Extinktionen darstellen. Man erkennt den steilen Anstieg der Extinktion, der im Blaugrün beginnt. Auf dem Violettfilter Hg 405 ist die Extinktion bereits so hoch, daß schon Konzentrationen von 1 mg Fe^{+3}/l starke Störungen bei der Sm-Bestimmung hervorrufen können. Daher werden schon Eisengehalte von 0,001%, wie sie in den Erdoxyden häufig vorhanden sind, die Bestimmung stark beeinträchtigen. Hierzu kommen dann noch die Eisengehalte, die selbst durch analysenreine Reagenzien eingeschleppt werden, so daß die Zuverlässigkeit der Messung schließlich vollkommen in Frage gestellt wird.

Da das Fe^{+2} im Gegensatz zu Fe^{+3} keine Extinktion auf Filter Hg 405 gibt, war es naheliegend, den Einfluß des Fe^{+3} durch Reduktion auszuschalten. Die in dieser Richtung geführten Versuche schlugen aber überraschenderweise fehl. Reine Eisenlösungen ließen sich vollkommen reduzieren, ebenso Lösungen, die neben dem Fe^{+3} bis zu 100 g Ce_2O_3, Nd_2O_3,

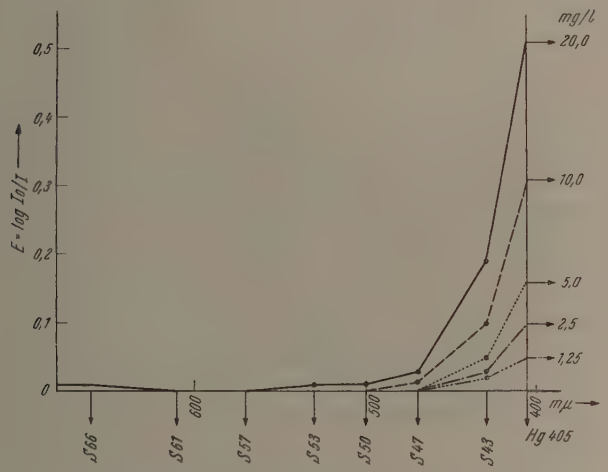


Abb. 2. Farbkurve der Extinktion Fe^{3+} in 2-n HCl; Schichtdicke: 5 cm

oder La_2O_3/l enthielten. Hingegen ist es niemals gelungen, in Gegenwart von Pr-Ionen das Fe^{+3} vollständig zu reduzieren. Es bleibt stets ein gewisser Anteil Fe^{+3} unreduziert, der zwar bei abnehmender Eisenkonzentration bis zu einem Schwellenwert sinkt, aber nie null wird. Hierbei wurden folgende Reduktionsmittel versucht: schwefelige Säure, Zinn(II)chlorid, Hydroxylamin, Hydrazin, nascierender Wasserstoff. Der Grund für dieses eigenartige Verhalten des dreiwertigen Eisens in Gegenwart von Praseodym ist uns nicht bekannt. Eine Parallele hierzu bildet jedoch die von uns beobachtete Tatsache, daß Pr-Ionen die Fe-Rhodanidfärbung stabilisieren. Während in Pr-freien Lösungen von Erdchloriden die Fe-Rhodanidfärbung bald abblaßt — in Ce^{+3}-Lösungen kommt es überhaupt nicht zur vollen Entwicklung der Färbung —, tritt bei Anwesenheit von Pr in diesen Lösungen die volle Farbtiefe auf und die Färbung bleibt längere Zeit konstant. Pr wirkt hier demnach gleich stabilisierend wie bekanntlich die Zusätze von Wasserstoffperoxyd und Persulfat. Diese beiden eben geschilderten Tatsachen legen den Schluß nahe, daß den Pr-Ionen hierbei die Wirkung eines Oxydationskatalysators zukommt. Doch liegt für eine derartige Behauptung viel

zu wenig Beobachtungsmaterial vor. Daher sollen lediglich die beobachteten Erscheinungen vermerkt werden.

Versuche, das Fe^{+3} durch anorganische oder organische Komplexbildner zu binden und auf diese Weise auszuschalten, verliefen ebenfalls erfolglos, desgleichen die Bemühungen, das Eisen an der Quecksilberkathode abzuscheiden.

Nachdem sämtliche Bemühungen, die Fe^{+3}-Extinktion zu beseitigen, negativ verlaufen waren, blieben nur mehr zwei Wege offen, die eine Bestimmung des Sm im Pulfrich-Photometer ermöglichen konnten. Die erste Möglichkeit war, das vorhandene Fe^{+3} photometrisch als Rhodanid mit einem geeigneten Spektralfilter zu bestimmen (Filter S 53). Dann mußte die Gesamtextinktion Fe + Sm auf Filter Hg 405 ermittelt, die dem Eisengehalt entsprechende Extinktion einer besonderen Eichkurve entnommen und von der Gesamtextinktion abgesetzt werden. Versuchsreihen zeigten, daß dieser Weg im Prinzip gangbar war, jedoch alle Nachteile eines Differenzverfahrens aufwies. In ungünstigen Fällen können bei Anwesenheit von viel Eisen bzw. Neodym kleinere Sm-Mengen im Streubereich der Methode untergehen. Besonders ungünstig fällt schließlich der Umstand ins Gewicht, daß man hierbei das Samarium wohl berechnen, aber nicht sehen kann.

Die Methode wurde daher bald zu Gunsten der letzten Möglichkeit, der Ätherextraktion des Fe^{+3}, verlassen. Es zeigte sich aber, daß es nicht möglich war, das Fe^{+3} als Chlorid durch Ausschütteln mit Äther vollkommen zu entfernen, selbst bei Verwendung einer Apparatur zur kontinuierlichen Extraktion. Dagegen gelang schließlich die vollständige Entfernung des Fe^{+3} durch Ausäthern des Rhodanids. Die Bedingungen hierfür lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die optimale Salzsäurekonzentration für die Ätherextraktion ist 2-normal. Bei zu hoher oder zu niederer Salzsäure-Konzentration geht das Eisenrhodanid nicht vollständig in die ätherische Phase über. Auch entstehen bei abweichenden Konzentrationen Trübungen, die offenbar auf Zersetzung des Komplexes zurückzuführen sind.

2. Zur Erhaltung der Stabilität des Eisenrhodanidkomplexes muß ein großer Überschuß an Ammoniumrhodanid zugesetzt werden. Da dieses aber zum größten Teil in den Äther übergeht, muß nach dem ersten Ausäthern neuerlich eine Zugabe von Rhodanid erfolgen.

3. Nach dem Lösen der Ceritoxyde in Salzsäure wird Wasserstoffperoxyd zur Oxydation des Eisens und gleichzeitigen Reduktion des Ce^{+4} zugesetzt. Es ist nun von größter Wichtigkeit, daß auch die letzten Spuren Wasserstoffperoxyd vor der Extraktion zerstört werden. Beachtet man diesen Punkt nicht, so kann sich diese wäßrige Phase innerhalb weniger Minuten nach dem Ausäthern trüben und eine Messung wird dann unmöglich. Dieser Umstand war lange Zeit hindurch die Ursache

unliebsamer Störungen. Bringt man aber während des Auskochens ein kleines Stückchen Platinnetz (etwa 1 cm^2 groß) in die Lösung und engt auf ein kleines Volumen ein, so werden die letzten Spuren Wasserstoffperoxyd katalytisch zersetzt und die gefürchtete Trübung tritt nicht mehr ein. Die Lösung bleibt vielmehr einige Tage vollkommen klar.

4. Die durch Löslichkeit bzw. den Extraktionsvorgang mechanisch in die ätherische Phase gelangende Menge an seltenen Erden ist gering. Sie beträgt etwa 0,4% der angewendeten Oxydmenge. Die relative Zusammensetzung dieser gelösten Oxyde gibt keinen Hinweis auf selektive Bevorzugung eines bestimmten Elementes. Der Betrag dieser Löslichkeit liegt bedeutend unter der Fehlergrenze der Messung und kann überdies dadurch eliminiert werden, daß man bei Aufstellung der Eichkurven analog wie bei den Bestimmungen vorgeht.

5. Zur quantitativen Extraktion des Eisenrhodanides hat sich ein hierfür konstruierter Doppelweg-Scheidetrichter (Abb. 3) ganz besonders bewährt. Dieser kleine Apparat ermöglicht eine vollkommen saubere Trennung der wäßrigen und ätherischen Phase, wobei das lästige Verschleppen von Resten der einen Phase in die andere weitgehend vermieden wird. Er dürfte sich auch bei anderen analytischen Extraktionen gut verwenden lassen.

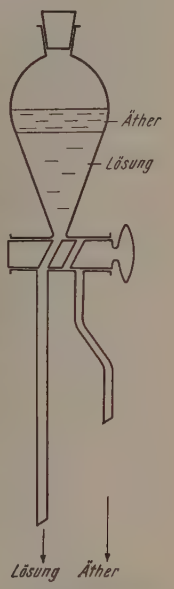


Abb. 3. Doppelweg-Scheidetrichter, ca. 120 ml

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse wurde folgende Arbeitsweise für die Sm-Bestimmung entwickelt:

Von den auf Sm_2O_3 zu untersuchenden Oxydgemischen wird durch doppelte Oxalsäurefällung und Verglühen der Oxalate in Porzellangefäßen (nicht in Pt-Gefäßen!) eine ausreichende Menge Oxyd hergestellt. 5 g dieses Oxydes werden in Salzsäure gelöst und der Salzsäureüberschuß durch Eindampfen bis zur beginnenden Kristallisation entfernt. Man überführt in ein kleines Bechergläschen und setzt Wasserstoffperoxyd (20 Tropfen 3%iges H_2O_2) zur Oxydation des Eisens und zur Reduktion des Ce^{+4} zu. Dann kocht man auf ein ganz kleines Volumen ein, wobei man ein kleines Platinnetz in die Lösung einbringt. Nun überführt man in den vorerwähnten Doppelweg-Scheidetrichter, dessen Hahn mit konz. Salzsäure geschmiert wird, und setzt soviel konz. Salzsäure zu, daß die Lösung nach Zugabe der Rhodanidlösung ca. 2-n an Salzsäure wird (14 ml Lösung, 6 ml konz. HCl, 10 ml 50%ige NH_4CNS-Lösung). Man fügt die 10 ml Ammoniumrhodanidlösung (50%ig) zu und schüttelt mit 20 ml Äther kräftig unter Kühlung am

rinnenden Wasserstrahl. Nach Trennung der Schichten läßt man die wäßrige Lösung links in das vorbenützte Becherglas ablaufen, während die ätherische Phase rechts abgezogen wird. Die in der Hahnbohrung und im Ablaufrohr zurückgebliebenen Reste der Untersuchungslösung werden mit etwas Äther in das Bechergläschen gespült. Das Ausäthern wird ein zweites Mal unter Zusatz von 5 ml Rhodanidlösung und schließlich noch ein drittes Mal ohne Rhodanidzusatz wiederholt. Die ätherische Phase muß hierbei farblos sein. Eine blaßrosa Färbung würde ein viertes Ausäthern bedingen. Man läßt dann die ausgeätherte eisenfreie Lösung in ein 50-ml-Meßkölbchen abfließen, entfernt den Äther nach rechts und wäscht Bechergläschen, die verwendete kleine Mensur und den Scheidetrichter in den Meßkolben nach. Schließlich wird zur Marke aufgefüllt und durch ein kleines Blaubandfilter filtriert, um suspendierte Ätherröpfchen zurückzuhalten. Dann wird die Extinktion der Lösung in der 5-cm-Küvette mit dem Filter Hg Cd 405 und der Quecksilberlampe gemessen.

Die Aufstellung der Eichkurven erfolgt mit reinen Sm-Lösungen in der eben beschriebenen Weise.

Die obere Kurve der Abbildung ist die Eichkurve bei Verwendung des Filters Hg 405. Ihre Krümmung zeigt, daß — wie zu erwarten war —

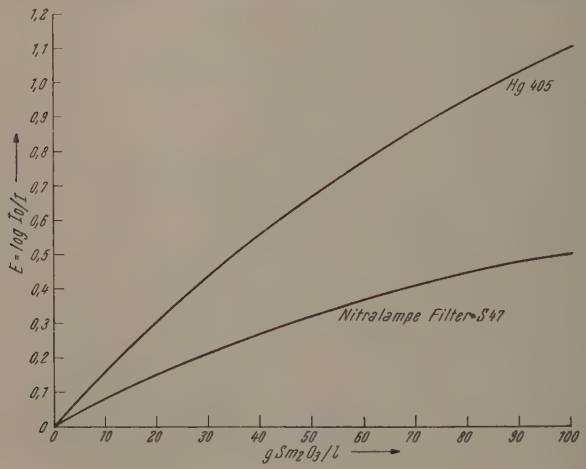


Abb. 4. Sm_2O_3 in HCl-Lösung; Schichtdicke: 5 cm

das *Beer*'sche Gesetz hier keine Gültigkeit hat. Als Abszissen sind g Sm_2O_3/l eingetragen, als Ordinaten die in 5-cm-Schicht gemessenen Extinktionen. Verwendet man Einwaagen von 5 g und füllt auf 50 ml auf, so geben die Abszissenwerte direkt die Prozente Sm_2O_3 im Gemisch an. Wie aus der

Kurve weiters hervorgeht, ist die Empfindlichkeit der Methode nicht besonders groß, da ja das Sm-Spektrum ziemlich schwach ist. Die geringste nachweisbare Sm-Menge beträgt ca. 1% Sm_2O_3 im Oxydgemisch. Die Fehlerstreuung liegt bei geringeren Gehalten bei ca. $\pm 1\%$ Sm_2O_3 absolut, bei höheren Sm-Konzentrationen bei ca. ± 2 bis 2,5% absolut. Leider läßt sich die Methode nicht in den Mikromaßstab übertragen, da bei zu kleinen Sm-Konzentrationen bzw. zu geringen Schichtdicken das Absorptionsspektrum des Sm verschwindet. Modellversuche, die mit Lösungs- und Oxydgemischen der Ceriterden durchgeführt wurden, zeigten, daß die Intensität der Sm-Bande durch gleichzeitige Anwesenheit anderer Erden nicht meßbar beeinflußt wird.

Versuche, die photometrische Sm-Bestimmung mit der eingangs erwähnten photometrischen Pr- und Nd-Bestimmung zu kombinieren[4], zeigten nur zum Teil Erfolg. Sm und Nd ließen sich gut nebeneinander bestimmen, während Pr, das durch Differenzmessung bestimmt werden muß, meist zu niedrig ausfällt. Es ist deshalb die übliche Pr-Bestimmung am Spektroskop durch Intensitätsvergleich der Analysenbanden zwischen der Probe und einer Standardlösung vorzuziehen.

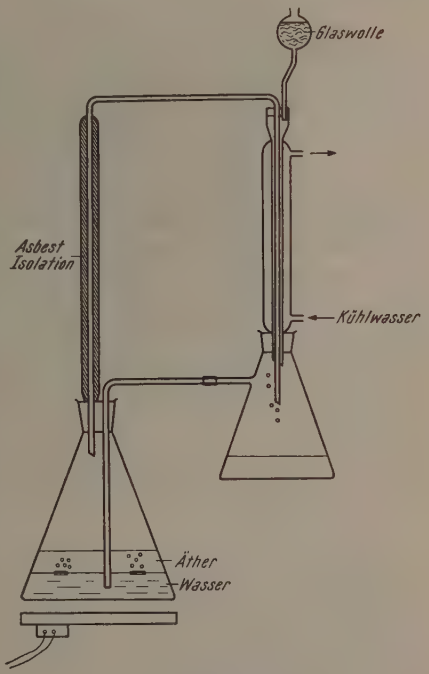


Abb. 5. Äther-Destillation

Bei den Bestimmungen fallen große Mengen stark verunreinigten Äthers an. Man wäscht den Äther zuerst mit Wasser und destilliert ihn dann über Wasser ab. Wir haben hierfür eine kleine Apparatur gebaut, die es gestattet, den Destillationsprozeß beinahe unbeaufsichtigt und ohne Belästigung durch Ätherdampf durchzuführen. Der Äther wird im Destillierkolben mit ungefähr dem gleichen Volumen Wasser versetzt und mittels einer schwachen Heizplatte abdestilliert. Zur Verhinderung des Stoßens haben sich kleine Holzstückchen als „schwimmende Siedesteine" bewährt. Der Ätherdampf steigt durch das wärmeisolierte Rohr auf und kondensiert teils im in-

nersten Rohr, teils im Kühler. Der Rest des schweren Dampfes geht durch die Querleitung in den Destillierkolben zurück. An der oberen Entlüftung ist bei ordnungsgemäß geführter Destillation kaum Äthergeruch wahrzunehmen. Der Großteil der noch im Äther vorhandenen Verunreinigungen wird während der Destillation vom Wasser aufgenommen.

Der so destillierte Äther enthält noch geringe Mengen Schwefelwasserstoff und Sulfide. Er wird mit Bleiacetatlösung und Wasser gewaschen, nochmals über Wasser destilliert und schließlich über Calciumchlorid getrocknet.

Zusammenfassung

Samarium läßt sich in Chloridlösungen durch seine Absorptionsbande mit Spitze bei 4016 Å im Pulfrich-Photometer unter Verwendung monochromatischen Lichtes der Quecksilberlinie Hg 4047 Å bestimmen. Diese Bande wird weder von Pr, noch von Nd gestört. Lediglich größere Mengen Er bzw. Eu würden stören, doch sind diese in den Ceriterdengemischen nicht oder zumindest nicht in störenden Konzentrationen vorhanden. Von entscheidender Bedeutung für das Gelingen der Analyse ist die restlose Entfernung auch der geringsten Eisenspuren, da diese durch ihre Extinktion stören. Da sich Fe^{3+} bei Anwesenheit von Pr in Lösung nicht vollkommen in die nichtstörende zweiwertige Stufe überführen läßt, muß es durch Ätherextraktion entfernt werden. Diese erfolgt durch Ausäthern des Eisenrhodanides in einem besonders konstruierten Scheidetrichter. Da das Absorptionsspektrum des Sm verhältnismäßig schwach ist, beträgt die geringste nachweisbare Sm-Konzentration nur ca. 1% Sm_2O_3 im Oxydgemisch. Die Fehlergrenze liegt bei kleinen Sm-Gehalten bei ca. $\pm$ 1% Sm_2O_3 absolut und steigt bei höheren Gehalten bis auf $\pm$ 1,5—2,5% Sm_2O_3 absolut.

Summary

Samarium can be determined in chloride solutions through its absorption band with a peak at 4016 Å, employing the monochromatic light of the mercury line Hg 4047 Å. There is no interference with this band by either Pr or Nd. Only large amounts of Er or Eu would interfere. However, these are not present in cerite earths or at least not in interfering concentrations. It is of decisive importance to the analysis that even the slightest trace of iron be removed, since its extinction interferes. Since Fe^{+3} cannot be completely converted into the harmless divalent state if Pr is present in the solution, the iron must be removed by extraction with ether. This is done by extracting the iron thiocyanate in a separatory funnel of special design. Since the absorption spectrum of Sm is relatively weak, the lowest detectable Sm-concentration is only approximately 1% Sm_2O_3 in oxide mixtures. With small contents of Sm, the limits of error are about $\pm$1% Sm_2O_3 absolute. This rises to $\pm$1.5 to 2.5% Sm_2O_3 with higher contents.

Résumé

Il est possible de doser le Samarium dans les solutions de chlorures, à l'aide de sa bande d'absorption qui possède un maximum à 4016 Å, avec un photomètre de Pulfrich, en lumière monochromatique de la ligne du mercure à 4047 Å. Cette bande n'est pas altérée par la présence de Pr ou de Nd. Seules des grandes quantités de Er ou de Eu sont susceptibles d'apporter une perturbation, mais dans les mélanges de terres cériques ils sont soit absents, soit en concentrations trop faibles pour être gênantes. Il est particulièrement important, pour la réussite de l'analyse, d'éliminer complètement jusqu'aux traces les plus minimes de fer dont l'extinction serait gênante. Comme Fe^{3+} ne peut être complétement réduit en Fe^{2+} (qui ne gêne pas), dans une solution contenant également Pr, il faut l'éliminer par extraction à l'éther. Cette opération est effectuée sur le sulfocyanate ferrique dans une ampoule à décantation spécialement fabriquée. Le spectre d'absorption du Samarium étant relativement faible, il en résulte que la plus faible concentration de Sm qu'il est possible d'identifier dans un mélange d'oxydes ne correspond qu'à environ 1% de Sm_2O_3 en teneur absolue. Les limites d'erreur atteignent environ $\pm 1\%$ (absolu) de Sm_2O_3 pour des faibles teneurs et croissent jusqu'à $\pm 1{,}5$ à 2,5% (absolus) de Sm_2O_3 pour des teneurs plus élevées.

Diskussion

H. *N. N.*: Bei der spektrophotometrischen und auch bei der kolorimetrischen Bestimmung seltener Erden gilt das *Beer*sche Gesetz nicht. Ich glaube, daß nicht das Eisen, sondern das Praseodym der störende Faktor ist. Mit den Valenzen der seltenen Erden scheint es nicht ganz zu stimmen. Weder Praseodym noch Neodym haben scheinbar die Valenzen, die in der Literatur angegeben sind. Wir haben bei einigen Versuchen feststellen können, daß diese beiden Elemente auch höhere Wertigkeiten annehmen können.

H. *R. Rasin-Streden:* Wir haben es bei Neodym probiert, haben aber die Störung nicht beobachtet. Auch nicht bei Cer und Lanthan. Wenn aber Praseodym in der Lösung vorhanden ist, so läßt sich das Eisen nicht vollständig reduzieren.

H. *N. N.:* Die Samarium-Linien sind viel schwächer und liegen fast in dem Gebiet des Neodyms. Sie können davon überdeckt werden.

H. *R. Rasin-Streden:* Nein, das können sie eben nicht, wenn man monochromatisches Licht verwendet.

H. *N. N.:* Es ist interessant, daß man bei der spektrophotometrischen Bestimmung der seltenen Erden immer auf die Chloride zurückgreift. Ich glaube, Sie haben das Problem richtig in Angriff genommen durch Anwendung eines Extraktionsverfahrens. So wird sich auch das Problem der Wertigkeit der seltenen Erden lösen lassen.

H. *R. Rasin-Streden:* Pr_6O_{11} ist in festem Zustand bekannt. Ich konnte diese Wertigkeitsstufe aber in Lösung nie feststellen. Ich wage es daher auf Grund der noch zu wenig zahlreichen Versuche nicht zu sagen, daß Praseodym irgendwie als Oxydationskatalysator wirkt.

Literatur

[1] *A. Brukl*, Angew. Chem. **52**, 151 (1939).
[2] *C. J. Rodden*, J. Res. Nat. Bur. Standards **26**, 557 (1941); **28**, 265 (1942).
[3] *Th. Moeller* und *J. C. Brantley*, Analyt. Chemistry **22**, 433 (1950).
[4] *R. Rasin-Streden*, Z. analyt. Chem. **127**, 97 (1943/44).
[5] *W. Prandtl* und *K. Scheiner*, Z. anorg. Chem. **220**, 107 (1934).

Aus dem Kontroll-Laboratorium der Riedel-de Haën Aktiengesellschaft, Chemische Fabriken, Seelze, Hannover

Photometrische Nickelbestimmung mit Natriumdimethylglyoxim

Von

Walter Nielsch und **Lieselotte Giefer**

(Eingelangt am 21. März 1955)

Die früher ausgeführten photometrischen Nickelbestimmungen gründen sich auf die Rotbraunfärbung des oxydierten Nickeldimethylglyoxims. Neuere, vorteilhaftere Verfahren beruhen auf der Extrahierbarkeit des Nickeldimethylglyoxims mit Chloroform [1,2]. Die rote Nickeldimethylglyoximverbindung ist in Chloroform mit gelber Farbe löslich, die hierbei die höchsten Extinktionswerte im Bereich von 360 bis 380 mμ aufweist. Eine weitere Verbesserung des Verfahrens stellt die Benutzung der Natriumverbindung des Dimethylglyoxims als farbbildendes Reagens dar, das den großen Vorteil hat, leicht wasserlöslich zu sein.

Benutzte Reagenzien und Apparaturen:

Alle Reagenzien waren von „Riedel-de Haën für Analyse"-Qualität. Für die photometrischen Messungen diente das Gerät Elko II der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, das mit dem UV-Kondensor II und Quecksilberbrenner bzw. Glühbirne in Verbindung mit dem Filter S 38 E verwendet wurde.

Nickelstammlösung: 2,4 g Nickelsulfat wurden in Wasser gelöst, mit 10 ml 10%iger Natriumtartratlösung und mit 40 ml Ammoniak versetzt und im Meßkolben auf 500 ml aufgefüllt. In einem Teil dieser Lösung wurde der Nickelgehalt elektrolytisch kontrolliert.

Nickelverdünnung: 10 ml Nickelstammlösung wurden mit 10 ml Ammoniak im Meßkolben auf 1000 ml aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung enthält somit 10 μg Nickel.

10%ige Natriumtartratlösung,

5%ige wäßrige Natriumdimethylglyoximlösung,

Chloroform,

Natriumsulfat, entwässert und gepulvert.

Arbeitstechnik:

Verschiedene Nickelmengen (10 bis 130 μg Nickel) wurden im zylindrischen Scheidetrichter mit 2 ml Natriumtartratlösung und 10 ml Natriumdimethylglyoximlösung kurz durchgeschüttelt. Aus einer Titrierbürette gibt man genau 30 ml Chloroform zu, schüttelt 1 Minute intensiv durch und läßt den größten Teil der Chloroformschicht in ein 50-ml-Erlenmeyerkölbchen ab, das mit einem Schliffstopfen verschließbar ist. Das Kölbchen ist vollständig trocken und wird zuvor mit 2 g Natriumsulfat beschickt.

Aufstellung einer Eichkurve:

Eine Eichkurve kann sowohl unter der Benutzung der Glühlampe in Verbindung mit dem Filter S 38 E wie auch mit dem Quecksilberbrenner ermittelt werden. Die günstigsten Ergebnisse werden mit dem Queck-

Gemessen mit Glühlampe.

Tabelle 1

50-mm-Küvette		
µg Ni	*D*	*E* ber.
10	82,36	0,0843
20	65,00	0,187
30	63,62	0,271
40	43,43	0,362
50	34,26	0,455
60	28,40	0,547
70	22,80	0,642

Tabelle 2

20-mm-Küvette		
µg Ni	*D*	*E* ber.
5		0,025
30	77,63	0,110
50	65,00	0,187
60	59,55	0,225
70	54,84	0,261
80	50,70	0,295
90	46,24	0,335
100	42,70	0,370

silberbrenner erhalten, da hierbei die monochromatische Lichtstrahlung der Quecksilberliniengruppe bei 366 mμ wirksam ist.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 1, 2 und 3 enthalten.

Tabelle 3

Gemessen mit Hg-Lampe

µg Ni	*D*	*E* ber.
30	76,21	0,118
50	64,16	0,193
70	53,26	0,360
90	43,69	0,360
100	40,28	0,395
110	36,51	0,438
120	33,50	0,475
130	30,96	0,510

Überprüfung des Lambertschen Gesetzes:

Eine Lösung von Nickeldimethylglyoxim (60 μg Nickel) in Chloroform wurde in Küvetten verschiedener Schichtdicke gemessen. Bei Anwendung monochromatischer Lichtstrahlung muß der Extinktionsmodul konstante Werte liefern.

Die Tabellen 4 und 5 zeigen bei Benutzung der Glühlampe eine fallende Tendenz des Moduls mit steigender Schichtdicke, während bei Verwendung des Quecksilberbrenners hinreichend konstante Modulwerte erhalten werden.

Tabelle 4

60 μg gemessen mit Glühlampe.

d	E	$\frac{E}{c \cdot d \cdot}$
0,498	0,060	0,00201
0,999	0,115	0,00192
1,991	0,225	0,00188
4,997	0,547	0,00182

Tabelle 5

100 μg gemessen mit Hg-Lampe.

d	E	$\frac{E}{c \cdot d \cdot}$
4,997	1,04	0,00208
1,991	0,409	0,00206
0,999	0,205	0,00206
0,498	0,103	0,00207

Sollen in der Praxis kleine Nickelmengen bestimmt werden, so ist es wichtig, die Mindestkonzentration zu kennen, die unter den vorstehenden Bedingungen noch vollständig erfaßbar und damit bestimmbar ist. 50 μg Nickel wurden in Lösungen abnehmender Konzentration wie oben bestimmt. Die gefundenen Werte zeigt Tabelle 6. Danach ergibt sich bei einer Nickelkonzentration der wäßrigen Phase von 1 μg Ni/ml ein Analysenfehler von -3%, der bei Absinken der Nickelkonzentration auf 0,7 μg Ni/ml auf -5% ansteigt.

Tabelle 6

μg Ni/ml	E	μg Ni gefunden
3	0,190	50,0
2	0,190	50,0
1	0,180	48,5
0,7	0,175	47,5

Liegen so kleine Nickelmengen vor, daß durch Einengen der Probelösung keine höheren Nickelkonzentrationen erreichbar sind, um fehlerfreie Bestimmungen durchführen zu können, ist es zweckmäßig, der Probelösung soviel einer bekannten Nickellösung zuzusetzen, daß eine Mindestkonzentration von 2 μg Ni/ml erreicht wird. Die kleinste noch bestimmbare Nickelmenge wurde nicht ermittelt, jedoch lassen sich 5 μg Nickel noch quantitativ sicher erfassen.

Praktische Anwendung des Bestimmungsverfahrens

Die Anwendung dieser Nickelbestimmung erscheint zunächst durch die vielseitigen Reaktionsmöglichkeiten des Natriumdimethylglyoxims mit anderen Kationen begrenzt. Durch geeignete Tarnmaßnahmen ist aber eine außerordentlich vielseitige Anwendungsmöglichkeit gegeben. Als Anwendungsbeispiel sei die Nickelbestimmung in Eisen und Eisenverbindungen hier beschrieben. Da Natriumdimethylglyoxim nur in alkalischen Lösungen beständig ist, muß diese Tatsache in den Arbeitsvorschriften

mitberücksichtigt werden. In Eisen und seinen Verbindungen läßt sich das Nickel in der vorstehend beschriebenen Weise bestimmen, wenn man das Eisen durch Weinsäure bzw. Natriumtartrat tarnt.

Arbeitsweise: 5 g Carbonyleisenpulver wurden in verd. H_2SO_4 gelöst, zur Oxydation des Eisens mit HNO_3 ($d = 1{,}4$) versetzt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen und im Meßkolben auf 200 ml aufgefüllt. Je 10 ml dieser Lösung (= 0,25 g Fe bzw. 0,9 g $Fe_2(SO_4)_3$) wurden in einen Schütteltrichter gegeben und mit steigenden Mengen Nickel versetzt. Dazu wurden nacheinander 20 ml 25%ige Natriumtartratlösung, 2 ml Ammoniak ($d = 0{,}91$), 10 ml 5%ige Lösung von Dimethylglyoxim-Natrium zugefügt und umgeschüttelt. Dann wurde mit genau 30 ml Chloroform 1 Minute geschüttelt. Um die geringen Mengen Eisenverbindungen, die sich eventuell in Chloroform lösen, sicher quantitativ zu entfernen, wurde die Chloroformschicht in einen zweiten Schütteltrichter abgelassen, mit 0,5 ml Salzsäure angesäuert, 5 ml Tartratlösung, 2 ml Ammoniak und 10 ml Natrium-Dimethylglyoxim-Lösung zugegeben und noch einmal 1 Minute geschüttelt. Die Chloroformschicht wurde dann in einen trockenen, verschließbaren und mit 2 g Natriumsulfat beschickten 50-ml-Erlenmeyer-Kolben abgelassen. In der 2-cm-Küvette wurde unter Benutzung des Filters S 38 E und der Hg-Lampe gegen die gleiche Menge Eisenlösung gemessen, die genau so behandelt wurde wie die Versuchslösungen, aber ohne Nickelzugabe. Das Carbonyleisen ist nicht nickelfrei, doch macht sich dieser Nickelgehalt bei dem hier angewandten Verfahren nicht störend bemerkbar.

Tabelle 7. Experimentelle Daten zur Arbeitsvorschrift

Zugefügte Ni-Menge in µg	*E*	Ni gefunden in µg
30	0,115	29,5
50	0,200	50,5
70	0,280	70
100	0,390	99

Um den Nickelgehalt des verwendeten Eisens zu ermitteln, wurden 10 ml der Eisenlösung (= 0,25 g Fe) wie oben beschrieben behandelt und gegen eine Blindlösung der Reagenzien gemessen. Die Extinktion dieser Lösung betrug 0,220, was einem Nickelgehalt von 55 µg bzw. 0,022% entspricht.

Nachdem der Nickelgehalt des benutzten Eisenpulvers so ermittelt war, wurden 10 ml Eisenlösung mit steigenden Nickelmengen versetzt, wie oben behandelt und gegen eine Blindlösung der Reagenzien gemessen. Die erhaltenen Werte zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8

Nickelzugabe in µg	*E*	Nickel gefunden in µg
30	0,335	85 (= 55 + 30)
50	0,415	105 (= 55 + 50)
70	0,500	126 (= 55 + 99)
100	0,604	154 (= 55 + 99)

Wie man aus den beiden Tabellen ersieht, läßt sich nach der angegebenen Arbeitsweise das Nickel mit einer Genauigkeit von $\pm$ 1% bestimmen. Die Methode stellt also ein sehr genaues Verfahren für die Spurenbestimmung von Nickel dar.

Zusammenfassung

Es wird gezeigt, daß sich Nickel in kleinen Mengen mit dem wasserlöslichen Natriumdimethylglyoxim fällen läßt. Die gebildete Nickelverbindung wird mit Chloroform extrahiert und nach Trocknung mit dem Gerät Elko II in Verbindung mit dem Quecksilberbrenner und UV-Kondensor mit Filter S 38 E photometriert. Für die Nickelbestimmung in Eisen und seinen Verbindungen wird eine Arbeitsvorschrift angegeben.

Summary

It has been shown that very small quantities of nickel can be precipitated with the water-soluble sodium dimethylglyoxime. The resulting nickel compound is extracted with chloroform. After drying, it is subjected to photometry with the Elko II device in conjunction with the mercury lamp and a S 38 E filter. A procedure is given for the determination of nickel in iron and its compounds.

Résumé

On montre qu'il est possible de précipiter de petites quantités de nickel par la diméthylglyoxime sodique qui est soluble dans l'eau. La combinaison de nickel formée est extraite dans le chloroforme où elle est dosée par photométrie après dessication; on utilise à cet effet, l'appareil ELKO II auquel on adjoint une lampe à mercure et un condenseur UV à filtre S 38 E. On donne un mode opératoire pour le dosage du nickel dans le fer et ses combinaisons.

Diskussion

H. *Th. Heczko* (Linz): Wie verhalten sich Kupfer und Kobalt bei dieser Bestimmung?

H. *W. Nielsch:* Diese Frage kann ich für das Natriumdimethylglyoxim nicht beantworten, weil ich das Verhalten von Kupfer gegenüber diesem Reagens noch nicht geprüft habe. Ich nehme an, daß ein von mir schon vor mehreren Jahren in einem Hüttenbetrieb angewandtes Verfahren der Nickelbestimmung in Kupfer und Kupferlegierungen mit Dimethylglyoxim vielleicht auch auf Natriumdimethylglyoxim umgestellt werden kann [(*W. Nielsch*, Erzmetall 8, 369 (1955)].

Kupfer, dessen Nickelgehalt mindestens 0,005% betrug, und Kupferlegierungen mit Nickelgehalten von 0,05 bis 20% wurden in folgender Weise

analysiert: Die in Salpetersäure gelösten Proben werden mit Natronlauge etwas abgestumpft und dann mit Natriumtartrat, Natriumthiosulfat und Hydroxylammoniumchlorid versetzt. Diese Zusätze dienen als Tarnmittel für Eisen, Kupfer und Mangan. Nach Zugabe von Dimethylglyoxim wurde mit Chloroform ausgeschüttelt und gemessen. Das Verfahren wurde so durchgebildet, daß das Analysenergebnis innerhalb von 3½ bis 4 Minuten nach Probeneingang zur Verfügung stand.

In Kobaltmetall und Kobaltsalzen ist die Nickelbestimmung mit Natriumdimethylglyoxim möglich. Hierbei wird die Kobaltsalzlösung nach einem zuerst von *Feigl* und *Kapulitzas* [Z. analyt. Chem. **82**, 417 (1930)] angegebenen Verfahren mit Kaliumcyanid versetzt, bis der entstandene Niederschlag gerade in Lösung gegangen ist. Unter gutem Schütteln wird Wasserstoffperoxydlösung zugegeben, bis die Färbung nach gelb umschlägt (Bildung von Kaliumkobalticyanid). Dann wird weitgehend eingedampft, das Nickel mit Formaldehyd demaskiert und mit Natriumdimethylglyoxim 30 Minuten stehen gelassen. Anschließend wird das Nickeldimethylglyoxim mit Chloroform extrahiert.

Es ist zu erwarten, daß sich in Verbindung mit geeigneten Tarnmitteln noch weitere Anwendungsmöglichkeiten für das Natriumdimethylglyoxim finden lassen.

Literatur

[1] *W. Nielsch*, Z. analyt. Chem. **140**, 268 (1953).
[2] *W. Nielsch*, Z. analyt. Chem. **143**, 273 (1954).

Institut für Analytische Chemie T. N. O. Rijswijk, Holland

Eine neue selektive und empfindliche Wismutbestimmung

Von

M. Oosting

Mit 2 Abbildungen

(Eingelangt am 14. März 1955)

Bei der Bestimmung von Wismutspuren in anorganischem Material ist es kaum zu vermeiden, daß nach Lösen der Probe eine geringe Wismutmenge in verhältnismäßig viel wäßriger Lösung vorhanden ist. Daher ist die Anwendung mikrogravimetrischer Methoden wie auch jener volumetrischen Methoden weniger angebracht, die auf der jodometrischen Titration (nach *Lang*) von Niederschlägen beruhen, die schematisch zusammengefaßt werden können durch die Formel [Base—Bi—J][1]. Aus diesem Grunde ziehen wir eine kolorimetrische Bestimmungsmethode vor.

Um die Empfindlichkeit zu steigern und Störung durch Eigenfarbe anderer Ionen zu beseitigen, empfehlen wir eine Methode, wobei eine gefärbte Wismutverbindung mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel extrahiert werden kann. Von den auf diesem Prinzip beruhenden Methoden nennen wir

1. die Bestimmung mit Dithizon[2]. Bei Vorhandensein vieler Salze soll aber keine völlige Extraktion zu erreichen sein. Die Trennung von größeren Mengen Blei scheint schwierig zu sein. Bei p_H 4 soll schon Blei, bei p_H 3 aber das Wismut erst nach öfterem Ausschütteln völlig extrahiert werden[3].

2. Die Bestimmung als Diäthyldithiocarbamat (DDC) durch Extraktion aus schwach saurer Lösung[4] ist wenig selektiv. Die Wismutextraktion als Diäthyldithiocarbamat aus alkalischer Lösung (p_H 11 bis 12) bei Anwesenheit von Kaliumcyanid und Komplexon soll sehr selektiv sein[5]. Die Lichtabsorptionsmessung findet jedoch bei einer Wellenlänge von 3650 Å statt, also außerhalb des Bereiches beider von uns benutzten Apparate (Engel-

Kolorimeter > 4300 Å, Coleman-Jr.-Spektrophotometer > 4000 Å), während Messungen mit einem Blaufilter weniger empfindlich sein sollen[5].

3. Die gelbe Farbe, die sich aus Wismut und Jodid bildet, kann mit einem Gemisch von Amylalkohol und Äthylacetat extrahiert werden[6]. Diese Bestimmungsmethode wird aber namentlich durch Antimon und Zinn stärker gestört als die von uns vorgeschlagene. Dazu kommt, daß in unserem Institut das Extraktionsverfahren häufig angewendet wird, weshalb wir nach einer größtmöglichen Einheitlichkeit der verwendeten Reagenzien streben. Da sehr viele Extraktionen mit Chloroform ausgeführt werden, ziehen wir es vor, auch für die Wismutextraktion Chloroform anzuwenden. Hierin ist aber die Wismut-Jodid-Verbindung unlöslich.

Wir untersuchten daher die Extrahierbarkeit der in der Mikrogravimetrie und -volumetrie gebrauchten Komplexe [Base—Bi—J]. Mehrere organische Basen bildeten zwar eine unlösliche Verbindung mit Bi- und J-Ionen, die sich aber leider auch fast alle als in Chloroform unlöslich erwiesen. Eine mit Chloroform extrahierbare Verbindung bildet sich jedoch bei Anwendung von Brucin als organische Base.

Aus der Extinktionskurve ist zu ersehen, daß eine Wellenlänge von 4300 Å (beim Gebrauch des Engel-Kolorimeters: Filter 45) für kolorimetrische Bestimmungen anwendbar sein muß (siehe Abb. 1).

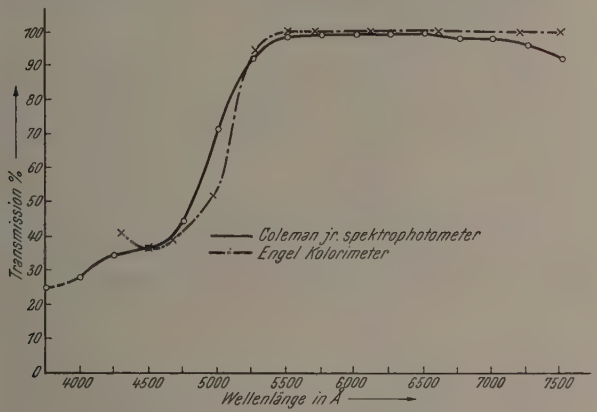


Abb. 1. Transmissionskurve für den Brucin-Bi-J-Komplex in Chloroform

Aus der Eichkurve ist zu entnehmen, daß das *Lambert-Beer*sche Gesetz bei den von uns gewählten Bedingungen (Auffüllen des Extraktes auf 25 ml) bis zu 400 μg Bi erfüllt wird (siehe Abb. 2). Störungen können auftreten bei Anwesenheit jener Ionen, die auch die gravimetrische Bestimmung stören, in diesem Fall zwar nicht, weil ein Jodidniederschlag (Ag,

Cu, Hg, Pb) fälschlich als Wismutverbindung gewogen würde, sondern weil ein solcher Niederschlag, der vor der kolorimetrischen Bestimmung abfiltriert wird, Wismut einschließen könnte. Cadmium stört, vielleicht durch Komplexbildung mit Jodidionen, genau so wie bei der Wismutbestimmung mit Jodid[6]. Antimon und Zinn stören, da sie gleichfalls mit Jodid und Brucin extrahierbare, gefärbte Komplexe bilden. Die Störung ist jedoch verhältnismäßig geringer als eine vergleichbare Störung bei der Wismutbestimmung durch Extraktion des Jodidkomplexes.

Eine mögliche Störung durch oxydierende Verbindungen (Jodbildung) kann beseitigt werden durch Zusetzen von schwefliger Säure.

Wenn eine solche Störung dieser Methode zu befürchten ist, kann das Wismut vorher als Diäthyldithiocarbamat von nahezu allen anderen Elementen abgetrennt werden[5].

Wir untersuchten diese Abtrennung in verschiedenen Fällen, um festzustellen, ob auch bei größeren Mengen von Kupfer bzw. Blei neben Wismut noch eine quantitative Abtrennung möglich ist.

Die Resultate einiger Bestimmungen, sowohl direkt als auch nach vorhergehender Abtrennung mittels DDC sind in nachfolgender Tabelle zusammengefaßt (siehe auch Abb. 2).

µg Bi gegeben	Störende Ionen	µg Bi gefunden direkt	µg Bi gefunden mittels DDC
150	5 mg Cd^{2+}	118	148
150	5 mg Zn^{2+}	148	150
150	5 mg Al^{3+}, 5 mg Cr^{3+}	147	148
150	5 mg Co^{2+}, 5 mg Ni^{2+}	148	149
150	5 mg Ag^{+}	153	150
150	5 mg Hg^{2+}	150*	150
150	5 mg Sb^{3+}	179	149
150	5 mg As^{3+}	150	151
150	5 mg Sn^{4+}	184	149
150	5 mg Fe^{3+}	147	148
150	5 mg Mn^{2+}	152	147
150	25 mg Cu^{2+}	—	151
50	100 mg Cu^{2+}	—	50
30	250 mg Cu^{2+}	—	29
50	500 mg Cu^{2+}	—	51
275	250 mg Cu^{+2}	—	280
50	100 mg Pb^{2+}	—	51
50	250 mg Pb^{2+}	—	50
20	250 mg Pb^{2+}	—	18
200	250 mg Pb^{2+}	—	196

* Hier wurden 6 ml 10%ige Kaliumjodidlösung hinzugefügt; bei Anwendung von 3 ml KJ wurden 120 µg Bi gefunden. Der Hg_2J_2-Niederschlag störte ebensowenig wie der von AgJ, wenn die Chloroformextrakte vor der Messung filtriert wurden.

Ausführung der Wismutbestimmung

Wir verwenden zwischen 25 und 100 ml Lösung, die 10 bis 400 μg Bi enthalten darf. Von einer Metallprobe wird soviel eingewogen, daß zwischen 10 und 400 μg Bi zur Analyse gelangen. Diese Probe wird unter

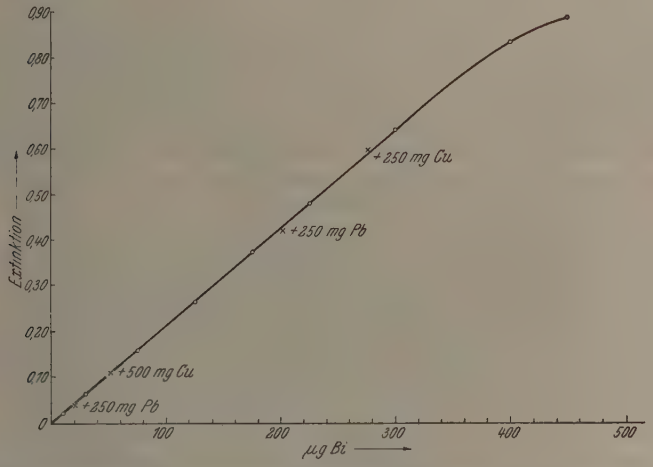


Abb. 2. Eichkurve für die kolorimetrische Bestimmung von Wismut als Brucin-Wismut-Jodid-Komplex. Engel-Kolorimeter. Filter 45. Extrakte auf 25 ml aufgefüllt

Erwärmen in möglichst wenig Salpetersäure ($d = 1{,}2$) gelöst und die Lösung nach dem Auskochen nitroser Gase mit Wasser auf etwa 50 ml aufgefüllt.

Organisches Material wird mit konz. Schwefelsäure bis zur beginnenden Nebelentwicklung erhitzt; dann wird langsam unter ständigem Erhitzen 70%ige Perchlorsäure zugetropft, bis die Lösung gerade klar ist; schließlich wird weiter erhitzt, bis wieder Schwefelsäurenebel auftreten. Nach dem Abkühlen wird mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

Reagenzien:

Natriumhydroxyd, 2-n;
Natriumcarbonat, 2-m;
Kaliumcyanid, 2½% und 10%;
Komplexon, 2½% und 10%;
Natriumkaliumtartrat, 10%;
Na-Diäthyldithiocarbamat, 250 mg in 250 ml 2%iger Sodalösung;
Brucin, 1% in 25%iger Zitronensäurelösung;
Kaliumjodid, 10%;
Schwefelsäure, 2-n;

Schweflige Säure, 1 Teil bei 20° C gesättigter wäßriger Lösung + 1 Teil Wasser.

In einem Schütteltrichter werden zu 50 bis 100 ml der Wismutlösung, die von 10 bis 400 μg Bi enthält und die 1- bis 2-n an Schwefelsäure ist, 2 ml SO_2-Lösung zugefügt, dann 3 ml 10%ige KJ-Lösung und schließlich 5 ml 1%ige Brucincitratlösung. Dann wird durch Schütteln gemischt und mit 5-ml-Portionen Chloroform extrahiert, die nach Filtrieren durch Glaswolle in dem Ablaufrohr des Schütteltrichters in einen trockenen 25-ml-Meßkolben abgelassen werden. In den meisten Fällen ist die Extraktion nach dem zweiten Male schon vollständig.

Der Meßkolben wird mit Chloroform angefüllt, der Inhalt homogenisiert und gegen eine Blindprobe bei einer Wellenlänge von 4250 Å (Coleman Jr.) oder mit Filter 45 (Engel-Kolorimeter) gemessen.

Bei Vorhandensein geringerer Mengen störender Elemente setzt man zur sauren Lösung 2 ml 10%iges Kaliumnatriumtartrat, 2-n NaOH, bis die Lösung gerade alkalisch reagiert, 3 ml 2-m Sodalösung, 2 ml 2½%iges Komplexon, 2 ml 2½%iges KCN, und stellt mit NaOH das p_H auf 11 bis 12 ein. Dann werden 5 ml Na-DDC zugefügt und mit 3 × 5 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte werden in ein Becherglas, das 25 ml 2-n H_2SO_4 enthält, abgelassen. Dieses Becherglas wird vorsichtig (am besten auf einer elektrischen Heizplatte) erwärmt. Nachdem alles Chloroform verdampft ist, wobei das Wismut in die wäßrige Phase übergeht und das DDC zerstört wird, bringt man die Lösung quantitativ in einen Schütteltrichter und bestimmt das Wismut, wie vorher beschrieben.

Wenn größere Mengen störender Ionen vorhanden sind, muß vor der Abtrennung mittels DDC mehr KCN und/oder Komplexon zugefügt werden. Wenn die Art der störenden Ionen bekannt ist, entnimmt man den Angaben von *Bode*[5], ob mehr KCN und/oder mehr Komplexon zur erwünschten Komplexierung führen. Bei Anwesenheit größerer Mengen störender Ionen ist zu empfehlen, 10%ige Lösungen von KCN und Komplexon zu gebrauchen. Die davon benötigten Mengen müssen für jeden einzelnen Fall berechnet oder bestimmt werden. Zur Orientierung führen wir an, daß zur Komplexierung von 250 mg Kupfer etwa 10 ml 10%iges KCN, von 250 mg Blei etwa 15 ml 10%iges Komplexon notwendig waren.

Der Autor möchte an dieser Stelle Frl. *A. M. G. de Wit* für ihre gewissenhafte und genaue Arbeit bei der Entwicklung dieser Methode herzlich danken.

Zusammenfassung

Wismut kann durch Extraktion des Brucin-Wismut-Jodid-Komplexes mit Chloroform und Messung der Lichtabsorption bei 4250 Å bestimmt werden. Die Bestimmung wird wenig gestört; wenn jedoch Störungen

auftreten, kann das Wismut vorher mittels einer Diäthyldithiocarbamat-Extraktion bei p_H 11 bis 12 in Gegenwart von Kaliumcyanid und Komplexon von nahezu allen Elementen abgetrennt werden, auch wenn diese in großem Überschuß vorhanden sind.

Summary

Bismuth can be determined by extracting the brucine-bismuth-iodide complex with chloroform and measuring the light absorption at 4250 Å. The determination is disturbed but little. If interferences occur at all, the bismuth can be isolated if necessary by extracting with diethyldithiocarbamate at p_H 11 to 12 in the presence of potassium cyanide and complexone. This separation succeeds from almost all elements, and even if the latter are present in large excess.

Résumé

Le bismuth peut être dosé par extraction du complexe brucine—bismuth—iodure par le chloroforme et mesure de l'absorption de la lumière pour la longueur d'onde de 4250 Å.

Il existe peu de substances gênantes pour cette détermination; toutefois, le cas échéant, il est possible de séparer le bismuth de la plupart des autres éléments, même s'il en existe un excès considérable, par une extraction préalable par le diéthyldithiocarbamate à p_H 11 à 12 en présence de cyanure de potassium et de complexon.

Diskussion

H. *H. Svejda* (Wien): Wie ich weiß, haben Sie an Ihrem Institut einen Spektrographen. Warum haben Sie nicht eine spektrographische Methode angewendet?

H. *M. Oosting:* Eine solche Methode wäre natürlich anwendbar, aber nur dann, wenn man über genügend Standardproben verfügt. Bis jetzt ist es bei uns noch nicht so weit. Wir haben einige Kupferstandardproben mit Wismutmengen zwischen 10^{-4} und 10^{-3}%. Damit kann man innerhalb dieses Gebietes Wismut sehr rasch und genau in Kupfer bestimmen. Die von mir beschriebene Methode war aber a priori nicht nur für gewisse Bestimmungen in anorganischem Material gedacht, sondern sie ist ohne weiteres auch für organisches Material nach vorhergehender Zerstörung zur Bestimmung des Wismuts geeignet. Die spektrographische Bestimmung ist nach unserer Ansicht noch wesentlich schwieriger als diese spektrophotometrische Methode.

Literatur

[1] *R. S. Beale* und *G. C. Chandler*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 43 (1942). *G. Aurisicchio*, Industria chim. **7**, 1358 (1932). *R. Berg* und *O. Wurm*, Ber. dtsch. chem. Ges. **60**, 1664 (1927). *F. Hecht* und *R. Reissner*, Z. analyt. Chem. **103**, 88 (1935). *P. Farrini*, Boll. chim. farm. **73**, 284 (1934). *I. M. Kolthoff* und *F. S. Griffith*, Mikrochim. Acta **3**, 47 (1938). *R. Sazerac* und *J. Pouzergues*, C. r. soc. biol. Paris **109** 370 (1932). *G. Canneri* und *B. Dino*, Ann. chim. analyt. chim. appl. **26**, 455 (1936). *M. François* und *L. Seguin*, J. pharm. chim. (8) **2**, 59 (1925). *M. V. Gapchenko* und *O. G. Sheintzis*, Zavodskaya Lab. **4**, 835 (1935). *J. R. Hayes* und *G. C. Chandler*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **11**, 531 (1939). *G. Spacu* und *P. Spacu*, Z. analyt.

Chem. **93**, 260 (1933). *G. Spacu* und *G. Suciu*, Z. analyt. Chem. **79**, 106 (1929). *S. Takaji* und *Y. Nagase*, J. Pharm. Soc. Japan **56**, 405 (1936).

[2] *L. A. Haddock*, Analyst **59**, 163 (1934).

[3] *D. M. Hubbard*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **11**, 343 (1939). *J. F. Reith* und *C. P. van Dijk*, Chem. Weekbl. **36**, 343 (1939).

[4] *S. L. Tompsett*, Analyst **63**, 250 (1938).

[5] *H. Bode*, Z. analyt. Chem. **143**, 182 (1954).

[6] *C. J. W. Wiegand*, *G. H. Lann* und *F. V. Kalich*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **13**, 912 (1941).

Aus dem Mineralogischen Institut der Universität Messina

Untersuchungen über die Aluminium-Sperrschicht

5. Mitteilung[2,3]: Über die Bedeutung der Homogenität, erläutert am Beispiel eines Reinstaluminiums

Von

F. Pavelka* und **R. Pieruccini**

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 28. Mai 1955)

Wenn in der chemischen Praxis von reinen oder reinsten Stoffen die Rede ist, so wird damit nie ein definierter Zustand bezeichnet, sondern es handelt sich um ein sehr oberflächliches Werturteil, das seine Wurzeln in einer subjektiven Bewertung des *augenblicklich* Erreichbaren hat.

Die Reinheit eines Stoffes ist aber von allergrößter technologischer Bedeutung: Die Kurven, die irgendeine physikalische Eigenschaft darstellen, streben für 0,0...0% einer verunreinigenden Komponente einem Maximum oder einem Minimum zu und sie ändern sich (wegen der exponentiellen Form der Kurve) praktisch sprunghaft beim Auftreten einer gewissen kleinsten Menge eines verunreinigenden Stoffes, die in manchen Fällen definiert werden kann. Das Gesagte gilt in hervorragendem Maße von den Metallen und einige klassische Beispiele auf diesem Gebiete sind wohl allgemein bekannt.

Wenn die Verunreinigungen eines Stoffes zu beurteilen sind, kann dies nach zwei Gesichtspunkten erfolgen:

1. Man kann entweder nur die Menge der Verunreinigungen in einer soweit als möglich dem Durchschnitt entsprechenden Probe in Betracht ziehen, wobei man mit einer homogenen Verteilung der Begleitstoffe rechnet. Unter homogener Verteilung müßte man streng genommen jenen statistischen Zustand verstehen, wie er in den Lösungen oder Gläsern vorliegt. Da dies jedoch nur äußerst selten der Fall ist, wäre es in jedem Falle wünschenswert, zur genauen Charakterisierung der in

* Adresse: Milano, Via Pisacane, 43.

Frage stehenden Substanz das *minimale Raumelement* anzugeben, das, an einer beliebigen Stelle entnommen, das *gleiche Analysenresultat* ergibt.

Zu diesem Zwecke schlagen wir vor, den negativen Logarithmus des reziproken Wertes des Volumens des minimalen Raumelementes (Volumen in cm^3), das an einer beliebigen Stelle entnommen die gleiche Zusammensetzung ergibt, als *Homogenitätsindex* zu bezeichnen.

2. Man kann auch auf die örtliche Verteilung der Zusatzelemente Rücksicht nehmen und diesen Fall zusätzlich dadurch charakterisieren, daß man das Verhältnis der Raumelemente mit verschiedener Konzentration des Zusatzelementes sowie den Konzentrationssprung an der Grenzfläche zweier derartiger Raumelemente angibt.

Es wäre wichtig, auch einen eindeutigen Ausdruck für die Art der Verteilung zweier (oder mehrerer) Phasen einführen zu können (Verteilungsindex oder Verteilungsgüte). Die Schwierigkeiten erscheinen aber vorläufig unüberwindlich. In die Gleichung müßten als Unabhängige eingehen:

a) das Volumenverhältnis der beiden Anteile,

b) der Homogenitätsfaktor,

c) ein Faktor, der die stereometrischen Verhältnisse möglichst genau wiedergibt (siehe später),

c) die Konzentrationsdifferenz der beiden Anteile.

Es wird sich aber bei solchen Systemen in ganz seltenen Fällen wirklich nur um zwei Phasen handeln können. Gewöhnlich wird die Grenzfläche gegenüber den beiden durch sie begrenzten Phasen ausgezeichnet sein. Wir haben es somit im allereinfachsten Falle schon mit drei Phasen zu tun und die allgemeinen Beziehungen werden zu unübersichtlich.

Wir wollen nun diese beiden Fälle etwas ausführlicher betrachten.

ad 1: Es ist eine leider immer wieder anzutreffende Oberflächlichkeit, sich den Raum als absolutes Kontinuum vorzustellen. Die Umwelt zeigt uns aber überall Unstetigkeiten neben Stetigkeiten. Wir müssen uns jedoch vor allem bewußt sein, daß der Begriff der Stetigkeit und Unstetigkeit durchaus relativ ist, da ein mehr oder weniger differenzierender Maßstab nur von der Empfindlichkeit der benutzten Untersuchungsmethode abhängt. Es können Vorgänge einerseits makroskopisch gesehen sehr schroffe Übergänge zeigen, während sie bei genügend starker Vergrößerung kontinuierlich sind, andererseits kann durch das Aufeinanderfolgen vieler enger Diskontinuitätsbereiche, die unterhalb des Auflösungsvermögens der Untersuchungsmethode liegen, eine stetige funktionelle Beziehung vorgetäuscht werden.

Wenn es also vom benutzten Maßstab abhängt, ob die Änderung eines Parameters als kontinuierlich oder als diskontinuierlich anzusehen

ist, so erscheint es klar, daß die Angabe des Maßstabes eine *wesentliche Voraussetzung* für die Beschreibung dieses Parameters ist.

Wollen wir in unserem Falle die Grundlage zur Beschreibung der chemischen oder strukturellen Diskontinuität schaffen, so können wir, da es sich um gestaltliche Körper handelt, den untersuchten Zustand durch Angabe stereometrischer Dimensionen, die von 0 bis ∞ variieren können kennzeichnen. Diesen großen Bereich kann man im Anschluß an *W. Ostwald*[1] in bestimmte Dimensionsgebiete unterteilen, und zwar:

I. Grobe Dimensionen

1. Astronomische Dimensionen.
2. Geographische Dimensionen.
3. Makroskopische Dimensionen. Ihre Größenordnung ist bestimmt durch die mit unbewaffnetem Auge noch sichtbaren Diskontinuitäten unserer Umgebung. Die untere Grenze liegt bei etwa 0,1 mm.
4. Mikroskopische Dimensionen. Ihre Größenordnung ist bestimmt durch die mikroskopisch auflösbaren Diskontinuitäten. Diese liegen zwischen 0,1 und 0,0005 mm.

II. Submikroskopische oder kolloidale Dimensionen. Ihre Größenordnung ist bestimmt durch die Diskontinuitäten zwischen Lichtwellenlänge und den Größen der typischen Moleküle. Ihr Bereich liegt zwischen 0,0005 und 0,000001 mm.

III. Amikroskopische (diskrete) oder analytische Dimensionen. Ihre Größenordnung ist bestimmt durch die diskreten Diskontinuitäten der Materie, d. h. durch die Dimensionen der typischen Moleküle. Sie liegen unterhalb 0,000001 mm.

Für die Zwecke des Chemikers kommen die Gruppen I, 1 und I, 2 nicht in Betracht. Wenn wir die *Ostwald*sche Einteilung der Dimensionen beibehalten wollen, können wir die Homogenität größenordnungsmäßig wie folgt charakterisieren:

a) als diskrete (analytische) Homogenität,
b) als submikroskopische (kolloide) Homogenität,
c) als mikroskopische Homogenität und
d) als makroskopische Homogenität.

Um den oben vorgeschlagenen Homogenitätsindex anschaulich zu gestalten, führen wir die Tabelle 1 an.

Wir halten es für ungemein wichtig, diese Überlegungen vor der Inangriffnahme von Analysen nicht zu vernachlässigen. Gerade die Mikroanalyse verleitet oft zur Probenahme von „Splittern", „eben sichtbaren Flittern" u. ä. m. *Die Analyse kann vollkommen wertlos sein, wenn die*

Tabelle 1

Minimales Raumelement mit gleichem Analysenresultat	Volumen in cm^3 V	$-\log \frac{1}{V}$	Dimensionen nach *Ostwald*	Homogenität
$(0{,}000\,000\,01\ cm)^3$	10^{-24}	24	diskrete Dim.	$>21 =$ diskrete Homogenität
$(0{,}000\,000\,1\ cm)^3$	10^{-21}	21		
$(0{,}000\,001\ cm)^3$	10^{-18}	18	kolloide Dim.	kolloide Homogenität
$(0{,}000\,01\ cm)^3$	10^{-15}	15		
$(0{,}000\,1\ cm)^3$	10^{-12}	12		
$(0{,}001\ cm)^3$	10^{-9}	9	mikroskopische Dim.	mikroskopische Homogenität
$(0{,}01\ cm)^3$	10^{-6}	6		
$(0{,}1\ cm)^3$	10^{-3}	3		
$(1{,}0\ cm)^3$	10^{0}	0	makroskopische Dim.	makroskopische Homogenität
$(10{,}0\ cm)^3$	10^{3}	-3		
$(100\ cm)^3$	10^{6}	-6		
$(1000\ cm)^3$	10^{9}	-9		
$(10\,000\ cm)^3$	10^{12}	-12	geographische Dim.	
$(100\,000\ cm)^3$	10^{15}	-15		
$(1\,000\,000\ cm)^3$	10^{18}	-18		
$(10\,000\,000\ cm)^3$	10^{21}	-21		
$(100\,000\,000\ cm)^3$	10^{24}	-24		

Größe der Analysenprobe nicht der Größenordnung der Homogenität angepaßt ist.

ad 2. In unserem Falle können wir je nach dem Dispersionsgrad der interessierenden bzw. unerwünschten Phase (Zusatzelemente bzw. Verunreinigungen) drei Fälle unterscheiden:

a) grobe Dispersion: feste Einlagerungen, Mischungen (Nebeneinanderbestehen von Kristallen oder Kristallaggregaten verschiedener Reinheit);

b) kolloide Dispersion: feste Sole;

c) analytische Dispersion: feste Lösungen, Mischkristalle.

Nur die beiden letzten Fälle entsprechen einem Zustand, der, vom analytischen Standpunkt betrachtet, als homogen bezeichnet werden kann. Besonderes Interesse verdient die *kolloiddisperse* Verteilung eines Zusatzelementes oder einer Verunreinigung. Vom formalen Standpunkt ist es ganz gleichgültig, ob die Dispersion *eine* (laminare Dispersion) oder *zwei* (fibrillare Dispersion) oder *drei* (korpuskulare Dispersion) Dimensionen betrifft. Nicht gleichgültig ist dies jedoch in bezug auf die Folgen in technologischer Hinsicht.

Nur im Falle der korpuskularen Dispersion können wir zu einer gleichförmigen stereometrischen Verteilung der dispersen Phase (Homo-

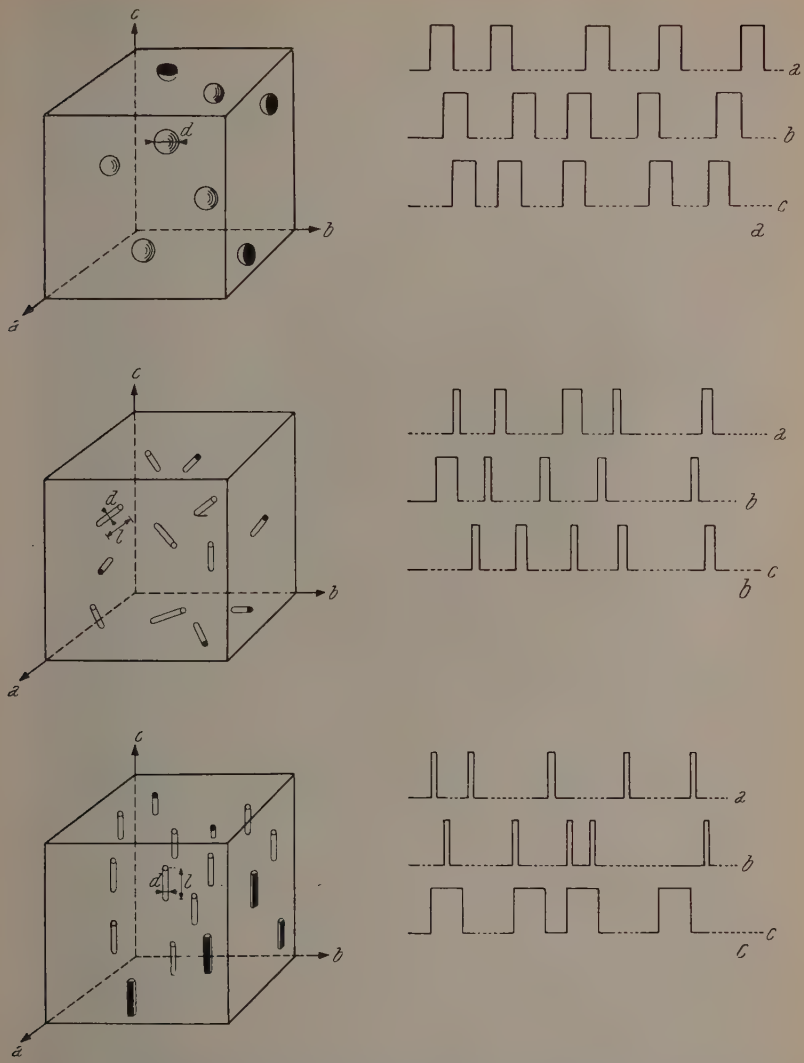


Abb. 1a. Korpuskuläre Dispersion. Gleichförmige stereometrische Verteilung. Konzentrationssprünge in Richtung der 3 Achsen: *a* (const) $\neq$ *b* (const) $\neq$ c (const) $\neq$ d

Abb. 1b. Fibrilläre Dispersion. Gleichförmige stereometrische Verteilung nur bei idealer Unordnung, wenn Teilchenabstand » Teilchendimension. Konzentrationssprünge in Richtung der 3 Achsen:

$$a\ (var) \Big/ \frac{c}{d},\ b\ (var) \Big/ \frac{c}{d},\ c\ (var) \Big/ \frac{c}{d}$$

Abb. 1c. Fibrilläre Dispersion. Geordnetes Aggregat, wenn Teilchenabstand < Teilchendimension. Konzentrationssprünge in Richtung der 3 Achsen: *a* (const) = *d*; b (const) = *d*; c (const) = l

genität des Materials) gelangen, bei der alle drei Dimensionen gleicherweise berücksichtigt sind (Abb. 1 *a*). Dieses wäre bei fibrillärer Dispersion nur bei idealer Unordnung der Fibrillen möglich (Abb. 1 *b*). Doch neigt diese Art von Dispersion bei der mechanischen Deformation mit Leichtigkeit zur Bildung geordneter Aggregate und infolgedessen differenzieren sich die Schnitte zweier Dimensionen (Linien) von der dritten (Punkte). Der Anteil der dispersen Phase in den betreffenden Schnittflächen kann bereits um Größenordnungen verschieden sein (Abb. 1 *c*).

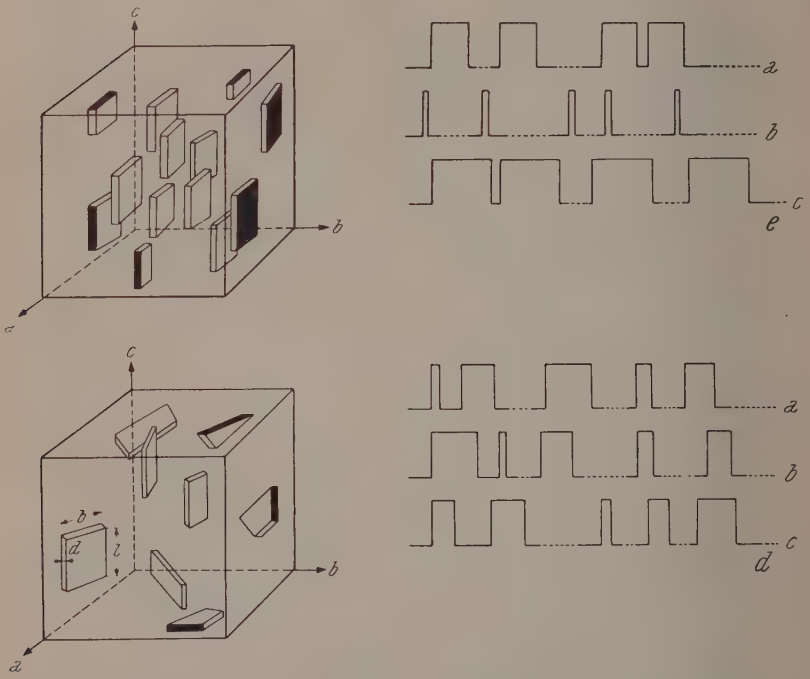


Abb. 1d. Laminare Dispersion. Gleichförmige stereometrische Verteilung nur bei idealer Unordnung, wenn Teilchenabstand » Teilchendimension. Konzentrationssprünge in Richtung der 3 Achsen:

$$a\ (var) \Big/ \frac{l}{d};\ b\ (var) \Big/ \frac{l}{d};\ c\ (var) \Big/ \frac{l}{d}$$

Abb. 1e. Laminare Dispersion. Geordnetes Aggregat, wenn Teilchenabstand < Teilchendimension. Konzentrationssprünge in Richtung der 3 Achsen:

$$a\ (\text{const}) = b;\ b\ (\text{const}) = d;\ c\ (\text{const}) = l$$

Noch bedeutender wird der Unterschied, wenn es sich um laminare Dispersion der zweiten Phase handelt (Abb. 1 *d*). Sind die beiden Flächendimensionen sehr klein in bezug auf den Abstand der einzelnen Teilchen, so kann es zu einer stereometrisch gleichmäßigen und ungeordneten

Verteilung dieser Teilchen kommen und es hängt dann von den Dimensionen der Teilchen, ihrem Abstand und der Empfindlichkeit der Analysenmethode ab, ob das Material als homogen befunden wird oder nicht. Auch im Falle der laminaren Dispersion spielt die Neigung zur Bildung geordneter Aggregate eine große Rolle. Solche geordnete Aggregate müssen sich aber bilden, sobald die Flächendimensionen größer sind als der Abstand der einzelnen Teilchen und die Ordnung wird umso vollkommener sein (Abb. 1 *e*), je größer das Mißverhältnis zwischen Flächenausdehnung und dem Abstand der laminaren Teilchen ist. Auch hier differenzieren sich wieder die Schnittflächen: In zwei Dimensionen erscheinen die dispersen Teilchen als Linien, in der dritten Dimension als Flächen. Wir können so in difformen Systemen dieser Art zu einem Grenzfall gelangen, nämlich, daß ein untersuchtes Flächenstück entweder *ausschließlich* durch die Fläche eines laminar-difformen Teilchens (laminar-difformes Teilchen parallel zur Oberfläche) dargestellt wird und die beobachteten Eigenschaften einem mengenmäßig geringfügigen Anteil des Materials zukommen, oder aber (laminar-difformes Teilchen normal zur Oberfläche) das Grundmaterial durch die Lamellen in Körperelemente zerteilt wird, so daß das Grundmaterial mit seinen spezifischen Eigenschaften durch Lamellen mit anderen spezifischen Eigenschaften eine Struktur erhält, die durchaus der Schaumstruktur ähnlich ist[2]. Während das gewöhnlich „Schaum" genannte Gebilde immer einen großen Kontinuitätssprung aufweist, kann in dem oben beschriebenen Fall der Kontinuitätssprung von sehr verschiedener Intensität sein. *Diese Art von Struktur ist ungemein verbreitet und beeinflußt, oft ausschlaggebend, das chemische und physikalische Verhalten der Stoffe.*

Um die den makroskopischen Körpern eigentümlichen Eigenschaften deuten zu können, darf man nicht nur die mikroskopischen Bauelemente berücksichtigen, sondern muß ganz besonders die gröberen Aggregate in Betracht ziehen, deren Dimensionen zwischen den diskreten Dimensionen einerseits und den makroskopischen Dimensionen andererseits liegen. Nicht — oder nicht nur — die chemisch-analytische Zusammensetzung, sondern die Art der Aggregation in gröberen Dimensionen ist mit ihren Folgen kennzeichnend für eine Reihe von Eigenschaften makroskopischer Gebilde.

Spezieller Teil

Bei der Beurteilung von Metallen müssen die erörterten Gesichtspunkte besonders dann herangezogen werden, wenn es sich um Probleme der Korrosion, der Polarisation, der Bildung von Schutzschichten u. ä. handelt und dies nicht nur bei der Auswertung und Beurteilung von Untersuchungsresultaten, sondern vorzüglich bei der technologischen Eignungsprüfung. Hiebei werden die allgemeinen Materialeigenschaften

oft auf das Niveau des „schwächsten Gliedes" degradiert und da die vorkommenden Konzentrationssprünge sehr erheblich sein können, ist dies oft mit einschneidenden technischen und wirtschaftlichen Folgen verbunden.

Auch bei oberflächlicher Betrachtung scheint die außerordentliche Wichtigkeit des Homogenitätsindex für Fragen der Korrosion und der Schutzschichtbildung auf. Dies gilt in ausgeprägtem Maße für das Aluminium, das wir hier im besonderen behandeln wollen.

Die Eigenschaften der Aluminiumsperrschichte leiten sich gleicherweise von den *chemischen* Eigenschaften der an ihrem Aufbau beteiligten Stoffe (Aluminium, Aluminiumoxyd, Aluminiumoxydhydrate, Art und Menge der adsorbierten Ionen, p_H des Mediums während der Bildung der Schutzschichte) als auch von *stereometrischen* Größen ab. Die Sperrschicht selbst ist ein laminar-disperses System von typischer Wabenstruktur mit Diskontinuitäten kolloidaler Dimensionen parallel zur Oberfläche des Aluminiums. Größe, Form und Verteilung dieser Diskontinuitäten sind Voraussetzung aller Eigenschaften, die der Schutzschicht eigentümlich sind.

Haben nun die Oberflächenanteile mit einer Konzentration der Zusatzelemente, die die zulässige Grenzkonzentration übersteigt, *kolloide* Dimensionen, so wird ihr Effekt auf die geometrische und strukturelle Gleichartigkeit der Schutzschicht einen praktisch zu vernachlässigenden Einfluß haben. Sind diese Oberflächenelemente aber wesentlich größer, so haben die resultierenden Fehlerstellen meßbare Folgen. Diese fallen in negativem Sinne weit mehr ins Gewicht als die erhöhte Güte der Schutzschicht auf den übrigen Flächenelementen erhöhter Reinheit und werden durch diese nicht kompensiert. Um die notwendige stereometrische und strukturelle Gleichartigkeit zu erreichen, muß ein Homogenitätsindex größer als 14 vorliegen*.

Im nachfolgenden wollen wir am Beispiel eines Reinstaluminiums (Raffinal, Hersteller: S. A. V. A., Porto Marghera, Italien) zeigen, zu welchen abnormalen Erscheinungen eine ungleichmäßige Verteilung der Zusatzelemente führen kann. Das Untersuchungsmaterial lag als Aluminiumfolie von 0,1 mm Dicke vor, die aus gegossenen Platten von ungefähr 40 kg gewalzt war. Vom Hersteller wird die Summe der Verunreinigungen mit 0,01% angegeben. Die quantitative spektrographische Analyse ergab:

* In diesem Zusammenhang scheint uns erwähnenswert, daß die Difformations- und Dispersitätsfunktionen niemals lineare Funktionen sind, sondern durch Maximum- oder Minimum- oder hyperbelartige Kurven dargestellt werden. Die charakteristischen Punkte dieser Kurven (Maximum bzw. Minimum bzw. Scheitel) dieser Funktionen liegen ausnahmslos im Gebiete der kolloidalen Dimensionen. (Wir verweisen beispielsweise auf Farbe, Lichtabsorption, Härte, Elektronenemission, photoelektrischen Effekt, heterogene Katalyse u. a. m.)

Fe	0,0030%
Cu	0,0005%
C	0,0025%
Ca	0,0040%
Mg	0,0025%
	0,0125%

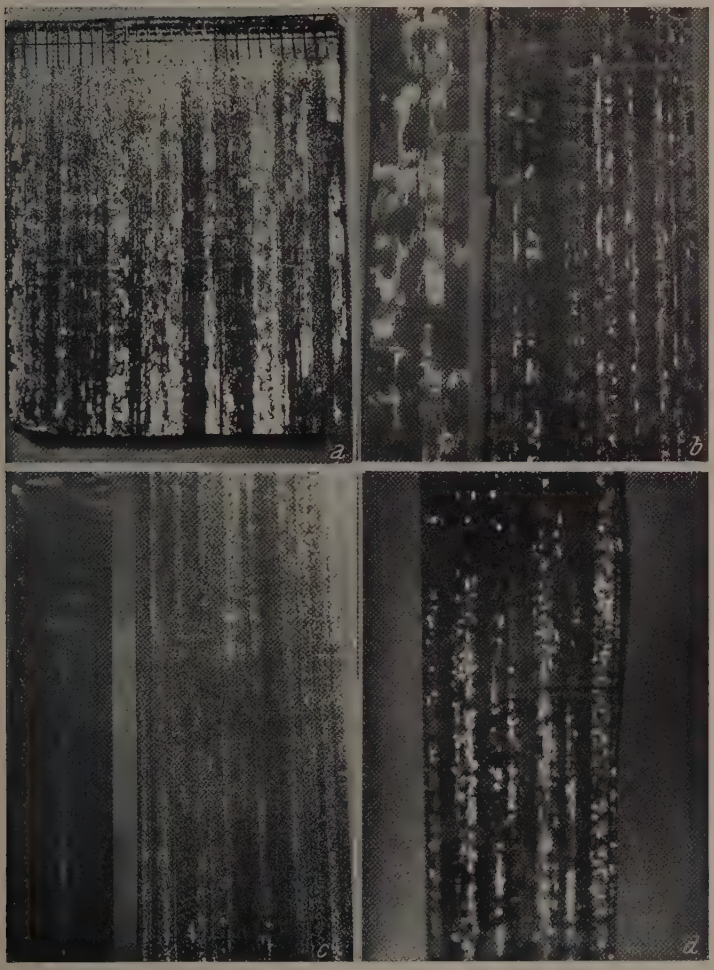


Abb. 2

Durch Ätzversuche war festgestellt worden, daß die Dimension der Kristallite in einigen Proben quer zur Walzrichtung bis zu 2 mm und mehr erreicht, während diese in der Walzrichtung zu langen Fäden oder Streifen auseinandergezogen sind. Für die spektrographische Analyse wurde das Aluminium daher in der Längsrichtung in Streifchen von 2 mm geteilt und diese einzeln der Untersuchung unterzogen (Abb. 2).

Methoden der spektrographischen Analyse

Aus den erwähnten Streifchen wurde ein Elektrodenpaar gewonnen, das parallel so in die Elektrodenhalter eingespannt wurde, daß die Entfernung 2 mm betrug. Die Funkenstrecke ist auf diese Weise horizontal (Abb. 3). In den ersten zehn Sekunden krümmen sich die Streifchen an den Enden. Der Zwischenraum wurde nun neuerdings auf 2 mm eingestellt und das Spektrogramm ohne weitere Nachregulierung aufgenommen. Die dem Abfunken unterworfene Fläche ist ungefähr 1,5 × 2,5 mm, die während der Untersuchung verdampfte Metallmenge ist praktisch unwägbar.

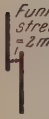


Abb. 3

Die Aufnahmen wurden mit dem Zeiss-Spektrographen Qu 24 ausgeführt. Weiters wurden verwendet: ein Funkenerzeuger nach *Feußner* mit einer Kapazität von 3000 pF und einer Selbstinduktion von 0,08 H, Platten „Ferrania ultracontrasto orto". Die Belichtungszeit war durchwegs 180 Sekunden, die Spaltbreite 0,01 mm mit Zwischenblende 0. Die Photometrierung der Platten erfolgte mit einem Spektrallinienphotometer von Zeiss mit einer Spaltbreite von 0,2 mm. Die Linien wurden 20fach vergrößert auf den Spalt projiziert; der Spalt entsprach somit 0,01 mm auf der Platte. Ein Vorfunken der Probe wurde nicht vorgenommen.

Die Messungen wurden in der üblichen Weise ausgeführt, und zwar an folgenden Linien, die unter den üblicherweise empfohlenen ausgewählt worden waren:

Analysenlinien:		Vergleichslinien:	
Ca I	3968,47 Å		
Cu I	3247,54 Å	Al I	3082,16 Å
C I	2478,55 Å		
Mg II	2802,69 Å		
Fe II	2755,74 Å	Al II	2816,19 Å

Mit Ausnahme des Calciums zeigten die Analysenlinien sehr geringe Schwärzungen, die ohne Zweifel Mengen dieser Elemente entsprechen, die sehr nahe, aber unter der Grenze der Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung liegen. Diese Schwärzungen befinden sich im Bereich der Unterexposition der verwendeten Platten, wenn auch ganz nahe dem

Beginn des brauchbaren Teiles der Belichtungskurve. Diese Tatsache rechtfertigt es, in den Abb. 4*a* und 4*b* numerische Werte anzuführen, die aber allen Voraussetzungen entsprechen, um *der Konzentration proportional zu sein.*

Die Berechnung der in den Figuren enthaltenen Werte wurde nach der Methode der mittleren reduzierten Ausschläge vorgenommen, um vergleichbare Resultate zu erhalten. Für jede Platte wurde das Mittel von 30 Ausschlägen der Linie Al I 3082,16 Å (Al_N) bestimmt und auf diesen Mittelwert die experimentellen Ausschläge bezogen. Auf diese Weise wurden die reduzierten Ausschläge erhalten nach der Gleichung:

$$\text{Ca } I_R = \text{Ca } I_{ex} \frac{\text{Ca } I_N}{\text{Ca } I_{ex}}$$

Die Berechnung wurde für jedes der fünf Elemente in bezug auf die reduzierten Ausschläge (D_r) der Linien Al I 3082,16 Å beziehungsweise Al II 2816,19 Å durchgeführt und für jeden Wert die Größe $D_o - D_r = I_r$ bestimmt. (D_o = durch den Schleier bedingter Ausschlag, D_r = reduzierter Ausschlag der gemessenen Linien, I_r = reduzierte Intensität). Auf diese Weise werden die numerischen Werte vergleichbar und in erster Annäherung der Konzentration proportional. Da unter diesen Bedingungen die Empfindlichkeit des Nachweises der untersuchten Elemente ungefähr von gleicher Größenordnung ist (nur das Kupfer ist ein wenig empfindlicher), geben die in den Kurven eingetragenen Werte die Konzentration wieder.

In beiden Analysenreihen verhalten sich Eisen, Kupfer, Kohlenstoff und Magnesium sehr ähnlich. Das Kupfer weist einen Schwankungsbereich von 1 : 40 auf, das Eisen übertrifft dieses Verhältnis noch, da sein Gehalt an vielen Punkten auf den Wert Null absinkt. Für Kohlenstoff und Magnesium sind die Schwankungen bescheidener und erreichen nur das Verhältnis 1 : 2. Der Calciumgehalt kann im üblichen analytischen Sinne als konstant angesehen werden.

Die angewendete Auswertungsmethode der Spektrogramme und die sich daraus ergebende Proportionalität der Analysenwerte erlaubt den Schluß, daß die Verteilungsgüte der Begleitelemente wirklich vom Calcium gegen das Eisen abnimmt. Das Calcium in besonderem Maße und das Magnesium zeigen eine ganz geringe Tendenz zur Anreicherung an den Korngrenzen, während diese für das Kupfer und noch mehr für das Eisen sehr ausgeprägt ist. Diese Tatsache würde noch augenfälliger, wenn der Analysenbereich, räumlich genommen, noch wesentlich eingeengt werden könnte.

Auf diese Überlegungen gründen sich die folgenden Schlüsse praktischer Natur. Die in den Abb. 4*a* und 4*b* dargestellten Konzentrationskurven zeigen, daß die Konzentration der verschiedenen Verunreini-

gungen über die Breite des untersuchten Probestreifens (75 mm) praktisch parallel verläuft. Nur wenige Analysenpunkte unter den 300 untersuchten

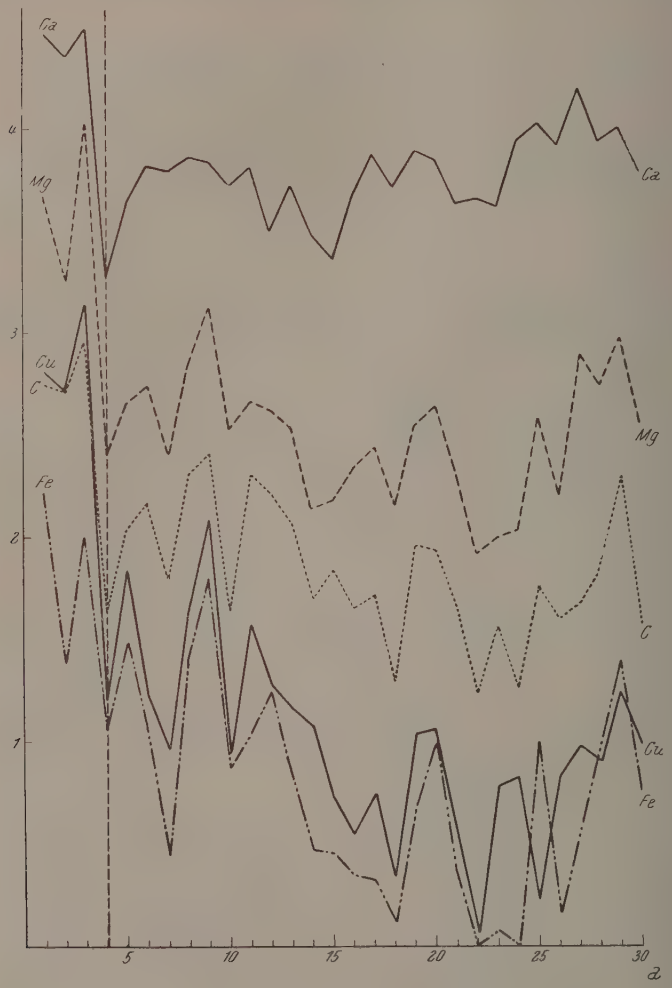


Abb. 4 a. Platte 1. Ca, Cu, C, Mg, Fe

folgen nicht dieser Regel und wir können sie daher vernachlässigen. Wir beobachten das Auftreten der Maxima und Minima an der gleichen Stelle und ein Anwachsen in der Reihung Ca < C < Mg < Cu < Fe.

Dieser Effekt kann nur teilweise der Abnahme der Liniendichte, die in demselben Sinne erfolgt, zugeschrieben werden.

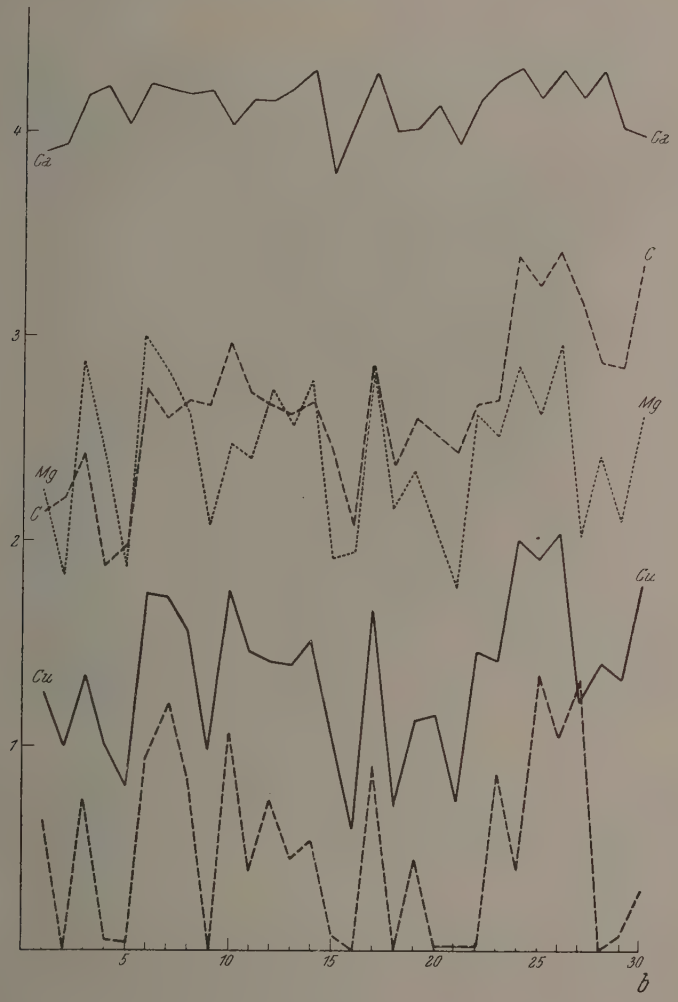


Abb. 4 b. Platte 2. Ca, Cu, C, Mg, Fe

Diese Analysenreihen betreffen das untere Grenzgebiet des makroskopischen Bereiches. Spektralanalytisch in den mikroskopischen Bereich einzudringen, scheint uns beim Aluminium mit überaus großen Schwie-

rigkeiten verbunden zu sein. Wir haben aber gerade dieses Metall gewählt, weil uns hier eine Methode zur Verfügung steht, die stereometrisch Gebiete erfaßt, die sicher im Grenzgebiet zwischen mikroskopischen und kolloidalen Dimensionen liegen.

Bei geeigneter Wahl des Elektrolyten kann durch anodische Oxydation eine Schutzschichte hergestellt werden, deren Durchschlagspannung von der Konzentration der verunreinigenden Elemente abhängig ist. Oxydiert man also zunächst eine Aluminiumprobe auf diese Weise und steigert dann die Spannung langsam, so erreicht man einen Zustand, bei dem dauernd Durchschläge der Schutzschichte erfolgen. Dies geschieht vorzugsweise an den Fehlerstellen der Schutzschichte, die durch die erhöhte Konzentration der Verunreinigungen (Zusatzelemente) bedingt sind.

Die photographischen Aufnahmen dieses Vorganges werden in einem anderen Zusammenhang veröffentlicht.

An diesem Beispiel sollte gezeigt werden, daß die chemische Analyse eines Flächenelementes (der Aluminiumfolie) ein Resultat ergibt, dessen Wert im Hinblick auf die spezifische Verwendung der Folie von der *Dimension* des Flächenelementes abhängt. Ist das Flächenelement zu groß (z. B. 1 bis 3 cm², was einem Gewicht von 30 bis 100 mg entspricht), erhält man einen Durchschnittswert, der aber in diesem Falle nur bedingten Wert hat. Führt man die Analyse an einem 100mal kleineren Flächenelement aus (200 bis 300 μg), so wird der Analysenwert vollkommen wertlos, wie die Abb. 4*a* und 4*b* augenfällig zeigen. Erst der Vergleich einer größeren Zahl von Einzelanalysen solcher kleinster Flächenelemente erlaubt ein Urteil über die Verteilung der Begleitelemente und eine relative Abschätzung deren maximaler und minimaler Konzentration.

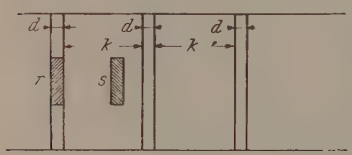


Abb. 5

Ganz allgemein ist dies an einem Beispiel in Abb. 5 erläutert. Diese stellt schematisch einige nebeneinanderliegende Kristallite von der Breite k dar, die durch Korngrenzen verschiedener Zusammensetzung von der Breite d getrennt sind. Nehmen wir an,

die Konzentration von Eisen in d sei $c_d = 1\%$
in k $c_k = 0$
$d = 0{,}01$ mm
$k = 1{,}00$ mm,

so erhalten wir in der Probe eine mittlere Konzentration: $c_m = 0{,}01\%$. Unterziehen wir nun ein Streifchen von der Breite a, das in der Längsrichtung entnommen und nach Abb. 3 als Elektrode verwendet wird, der Analyse, so können wir die beiden Grenzfälle erhalten:

Es kann a entweder ganz in $d(r)$ liegen oder ganz in $k(s)$ liegen und der bei der Analyse gefundene Gehalt (c_a) schwankt daher zwischen den Werten:

$$c_a = 0 \text{ und } c_a = c_{\bar{a}} = \frac{k}{d} c_m = 100\, c_m.$$

Alle anderen Möglichkeiten liegen *zwischen* diesen beiden Werten.

Besonders bei mikrochemischen Analysen ist es notwendig, sich vor jeder Probenahme über den Grad der Homogenität des Untersuchungsmaterials klar zu werden. Wenn wir es nicht mit analytischer Homogenität zu tun haben, *muß* nicht nur auf die *Menge*, sondern auch auf die *Form* der Probekörper sorgsam Rücksicht genommen werden.

Zusammenfassung

1. Zur Charakterisierung der Verteilung einer Verunreinigung oder eines Zusatzelementes (Zusatzstoffes) wird der *Homogenitätsindex* vorgeschlagen; er wird definiert durch den negativen Logarithmus des reziproken Wertes des Volumens (in cm³) des kleinsten Raumelementes, das, an einer beliebigen Stelle entnommen, stets die gleiche Zusammensetzung hat.

2. An einer Reihe von Dispersionsmodellen werden Fehlerursachen stereometrischer Natur erörtert.

3. Die Notwendigkeit der Berücksichtigung der Homogenität bei der Probenahme für mikrochemische Analysen wird an einer großen Reihe von spektrographischen Einzelbestimmungen (300) nachgewiesen. Diese zeigen, daß die Zusammensetzung der einzelnen Flächenelemente ganz beträchtlich und in einer die Materialeigenschaften bestimmenden Weise von der Durchschnittsanalyse abweicht.

Summary

1. To characterize the distribution of an impurity or of an added element (added substance), it is proposed to use the *homogeneity index*. This is defined by the negative logarithm of the reciprocal value of the volume (in cm³) of the smallest space element which, taken from any place at all, always has the same composition.

2. The sources of error of stereometric nature are mentioned with reference to a number of dispersion models.

3. The necessity of considering the homogeneity when taking samples for microchemical analyses is demonstrated by means of a great number (300) of individual surface elements deviates very distinctly from the mean analysis and in a manner determining the properties of the material.

Résumé

1. On recommande l'utilisation de *l'indice d'homogénéité* pour caractériser la répartition d'une impureté ou d'un élément (ou d'une substance) d'addition.

Cet indice est défini par le logarithme négatif de la valeur inverse du volume (en cm^3) de la plus faible fraction qui prélevée en un point quelconque présente toujours la même composition.

2. Sur une série de modèles de dispersion on a mis en évidence des causes d'erreur d'origine stéréométrique.

3. On montre la nécessité de tenir compte de l'homogénéité de la prise d'essai lors d'analyses microchimiques par l'examen d'une grande série de déterminations spectrographiques individuelles (300). Ces déterminations montrent que la composition des éléments superficiels individuels s'écarte de la valeur moyenne fournie par l'analyse d'une façon considérable qui dépend également des propriétés de la substance considérée.

Literatur

[1] *W. Ostwald*, Kolloid-Z. **55**, 267 (1931). Siehe auch: *A. v. Buzágh*, Kolloidik. Leipzig: 1936.

[2] *F. Pavelka*, Kolloid-Z. **84**, 303 (1938).

[3] *F. Pavelka*, Kolloid-Z. **106**, 206 (1944); **107**, 139 (1944); **109**, 145 (1944).

Istituto di Chimica Agraria dell'Università di Bologna

Neue Ergebnisse zur Mikrobestimmung der Phosphorsäure und ihre Anwendung zur Bestimmung der leichtest löslichen Phosphate in Böden

Von

Carlo Ferrari

(Eingelangt am 31. Mai 1955)

I. Neue Erkenntnisse über die Molybdänblau-Kolorimetrie

Seitdem *Denigès* vorgeschlagen hat, Spuren von Phosphor und Arsen mit einer neuen Methode zu bestimmen, die er „céruléo-molybdimétrie" genannt hat[1], sind Phosphormolybdänblau, Arsenmolybdänblau und Silicomolybdänblau in den verschiedensten Gebieten der Chemie angewandt worden. Obwohl noch nicht mit Sicherheit die Zusammensetzung dieser blauen Verbindungen feststeht, wird doch allgemein angenommen, daß sie sich durch Reduktion eines Teiles des sechswertigen Molybdäns der Heteropolysäuren zur fünfwertigen Form bilden. Für analytische Zwecke interessiert nur die Tatsache, daß die Extinktion der erhaltenen blauen Lösungen — unter bestimmten Arbeitsbedingungen — der Konzentration des zu bestimmenden Elementes, d. h. des P(V), As(V) und Si(IV), proportional ist.

Eine ganz besondere Beachtung verdient im Hinblick auf die biologische Bedeutung dieses Elementes die Mikrobestimmung des Phosphors sowie die der löslichen Kieselsäure, wobei besonderes Augenmerk auf die Möglichkeit einer Störung der Phosphorsäurebestimmung durch die Kieselsäure zu richten ist.

Neuere Untersuchungen des Verfassers haben wesentliche neue Erkenntnisse über die Phosphor- und Silicomolybdänsäure und ihre blauen Reduktionsprodukte gebracht: es ist anzunehmen, daß diese Klarstellungen dazu beitragen werden, endlich den schädlichen Empirismus zu beseitigen, der auf dem Gebiete der Molybdänblau-Kolorimetrie geherrscht hat. Besondere Bedeutung hat dies für die Bestimmung der Phosphorsäure, für die viele Forscher spezielle Vorschriften ausarbeiten

mußten, die einem bestimmten Zwecke dienen konnten, aber nicht allgemein anwendbar sind.

Da diese neuen Erkenntnisse die Grundlage der im zweiten Teil beschriebenen Arbeitstechnik darstellen, halten wir es für nützlich, sie hier kurz zusammenzufassen, während wir für nähere Details auf die zitierten Publikationen verweisen.

Es muß besonders hervorgehoben werden[2], daß die Phosphormolybdänsäure, die sich sofort bildet, wenn man eine Lösung, die weniger als 1 mg Phosphorpentoxyd enthält, unter geeigneten Bedingungen (pH) mit Molybdat zusammenbringt, in zwei verschiedenen Formen, einer gelben und einer farblosen, zu bestehen scheint. Es besteht eine Art Gleichgewicht zwischen diesen beiden Formen, das durch die Acidität und die Temperatur derart beeinflußt wird, daß eine Erhöhung der Temperatur und eine Erniedrigung des Säuregehaltes die Bildung der gelben Form bevorzugt vor sich gehen läßt.

Es konnte weiter gezeigt werden, daß das Zinn(II)chlorid, das eines der meistverwendeten Reduktionsmittel besonders auf dem Gebiete der Agrikulturchemie ist, beide Formen, die gelbe und die farblose, reduzieren kann, während die 1,2,4-Amino-naphthol-sulfonsäure*, das Reagens von *Zinzadze***, das Hydrazin und die Ascorbinsäure nur mit der gelben Form allein reagieren können. Da das Phosphormolybdänblau, das aus der gelben Form entsteht, eine von dem aus der farblosen Form gebildeten, deutlich verschiedene Absorptionskurve hat, ergibt sich die Notwendigkeit, nur die Reduktionsmittel der zweiten Gruppe anzuwenden und die Reaktion in der Wärme vorzunehmen, um so das Gleichgewicht gänzlich auf die Seite der gelben Form zu verschieben. Wir erhalten auf diese Art nur das der gelben Form entsprechende Molybdänblau. Es konnte nachgewiesen werden, daß nur auf diese Weise absolut genaue und reproduzierbare Analysenergebnisse erzielt werden können, wobei Hydrazinsulfat oder Ascorbinsäure als die empfehlenswertesten Reduktionsmittel zu gelten haben.

Eine andere erwähnenswerte Feststellung ist folgende: läßt man in der Kälte eines der Reduktionsmittel, das nur mit der gelben Form der Phosphormolybdänsäure reagiert, auf diese einwirken, so verläuft die Reaktion in zwei deutlich verschiedenen Stufen. Die erste Stufe verläuft in wenigen Minuten in der Kälte und besteht in der *Reduktion* eines Teiles des sechswertigen Molybdäns in die fünfwertige Form; die zweite Stufe spielt sich sehr langsam in der Kälte und rascher in der Wärme ab.

---

* Diese Säure, auch unter dem Namen Eikonogen bekannt, ist der wesentliche Bestandteil des Reagens von *Fiske* und *Subbarow*, das von den Biochemikern viel verwendet wird.

** Es besteht aus einer Lösung von Ammoniummolybdat, das mit Molybdänpulver teilweise reduziert ist, in konz. Schwefelsäure.

Sie besteht in einer Art *Stabilisierung* des molekularen Gefüges und führt zu jenem Molybdänblau, das eine definierte, konstante und charakteristische Absorptionskurve besitzt, der einzigen Form von Molybdänblau, die für analytische Zwecke verwertbar ist.

Endlich konnte noch festgestellt werden, daß die Acidität auf die Geschwindigkeit des Ablaufs sowohl der ersten Stufe (Reduktion) als auch der zweiten Stufe (Stabilisierung) einen sehr starken Einfluß hat, und zwar wird durch Erhöhung der Acidität die erste Stufe verlangsamt, während die zweite beschleunigt wird.

Wie allgemein bekannt, wird die Reaktion gewöhnlich in schwefelsaurer Lösung vorgenommen. Es ist nötig, die Säuremenge der verwendeten Molybdatmenge anzupassen. Man hat eine Molybdatmenge, die 60 mg MoO_3 entspricht, für günstig befunden, eine Menge, die sicher im Überschuß ist, wenn weniger als 1 mg Phosphorsäure-Anhydrid bestimmt werden soll. Zusammen mit dieser Molybdatmenge müssen 35 bis 40 ml n Schwefelsäure angewandt werden, um die Bildung des sogenannten „reinen" Molybdänblaus* zu verhindern, da dieses die kolorimetrische Bestimmung des Phosphors unmöglich machen würde.

Auf den eben dargelegten Tatsachen beruht die Arbeitstechnik zur Bestimmung von Spuren anorganischer Phosphate in Abwesenheit von Phosphorsäureestern, Arseniaten und löslicher Kieselsäure**.

Enthält die zu untersuchende Lösung außer anorganischem Phosphor auch Phosphorsäureester, so führt eine Erwärmung in saurem Medium zu deren Hydrolyse, die, wenn auch mehr oder minder unvollständig, falsche Ergebnisse zur Folge hätte.

Es ist aber trotzdem möglich, eine Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure durchzuführen, wenn man die bereits besprochene[3] Tatsache berücksichtigt, daß die Bildung „reinen" Molybdänblaus nicht

---

* Es besteht aus Oxyden des fünfwertigen Molybdäns, entstanden durch die Wirkung des Reduktionsmittels auf einen Teil der unverändert gebliebenen Molybdänsäure. Wenn die Reduktion in genügend saurem Medium durchgeführt wird, erhält man keine Blaufärbung, sondern eine Gelbfärbung, da die Mineralsäure das Molybdänpentoxyd bindet und seine Umsetzung mit der Molybdänsäure verhindert.

** Es wird folgendes Verfahren vorgeschlagen: Ein bekanntes Volumen (5 bis 50 ml) der Probelösung wird in einem 250-ml-Erlenmeyerkolben mit Wasser auf 70 bis 80 ml verdünnt und 5 ml 8-n Schwefelsäure und 5 ml der 1,44%igen Ammoniummolybdatlösung (1 ml dieser Lösung entspricht 12 mg MoO_3) hinzugefügt. Man setzt nun das Reduktionsmittel zu (2 ml der 2,5%igen, frisch bereiteten Ascorbinsäurelösung oder 1 ml 1%ige Hydrazinsulfatlösung) und stellt für 30 Minuten auf ein siedendes Wasserbad. Nach Abkühlen füllt man in einem Meßkolben auf 100 ml auf, mischt gut durch und führt die photometrische Messung aus. Aus der Extinktion der Lösung wird ihre Konzentration berechnet.

nur bei den oben angegebenen Schwefelsäurekonzentrationen, sondern auch bei geringer Acidität verhindert wird. Man kann in sehr schwach sauren Lösungen (p_H zwischen 4 und 5) die Stufe der „Reduktion" der Phosphormolybdänsäure in wenigen Minuten bei Zimmertemperatur zu Ende führen, wenn man als Reduktionsmittel Ascorbinsäure verwendet[4]. Um dann die zweite Stufe der Reaktion (Stabilisierung) ablaufen zu lassen, wurde rasches Ansäuern der in der Kälte „reduzierten" Lösung mit einer entsprechenden Menge Schwefelsäure und nachfolgende Erwärmung vorgeschrieben. Die hier verwendete Schwefelsäuremenge ist viel größer als die unter normalen Umständen notwendige, weil festgestellt werden konnte, daß das Phosphormolybdänblau, wenn es noch nicht stabilisiert ist, der Säure gegenüber viel widerstandsfähiger ist als die entsprechende Heteropolysäure (Phosphormolybdänsäure), und zwar auch in der Wärme. Die anzuwendende Säuremenge für die gewöhnliche Molybdatmenge (d. h. für 60 mg MoO_3) beträgt 17 ml 8-n Schwefelsäure. Sie wirkt nicht auf das Phosphormolybdänblau ein, ist aber imstande, die Bildung der Phosphormolybdänsäure zu verhindern bzw. diese zu zerstören. Man kann also ohne weiteres auf dem Wasserbad erwärmen, falls die angegebenen Reagenzienmengen angewendet werden, ohne befürchten zu müssen, daß es zu einer Zunahme der Färbung infolge der Freimachung von Phosphorsäure aus den in der Probe befindlichen Phosphorsäureestern kommen könnte.

Wenn man also nach den gemachten Angaben vorgeht, kann man Spuren von anorganischen Phosphaten in Gegenwart von organischen Phosphaten (auch sehr labilen) bestimmen, wenn man nur die „Reduktion" der Phosphormolybdänsäure bei einem möglichst hohen p_H (4 bis 5) und in kürzester Zeit (wenige Minuten) vornimmt.

Es wird empfohlen, nach der in der Fußnote* angegebenen Weise zu verfahren.

Eine Störungsquelle, der man immer Rechnung tragen muß, wenn man unter den eben beschriebenen Bedingungen anorganischen Phosphor in Gegenwart organischer Phosphate bestimmen will, kann bei der „löslichen Kieselsäure" liegen, die sowohl in biologischen Flüssigkeiten als

* Ein geeignetes Volumen der Probelösung (5 bis 50 ml), die einem Bruchteil eines mg an P_2O_5 entspricht, wird in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben pipettiert und eventuell auf ein p_H zwischen 4 und 5 mit einem Natriumacetat-Essigsäurepuffer abgepuffert. Man setzt 5 ml der 1,44%igen Ammoniummolybdatlösung (entsprechend 60 mg MoO_3) und 2 ml der 2,5%igen, frischbereiteten Ascorbinsäurelösung zu. Man läßt 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen, um die „Reduktionsphase", die zur Molybdänblaubildung führt, ablaufen zu lassen. Hierauf säuert man rasch und unter sorgfältigem Schütteln mit 17 ml 8-n Schwefelsäure an. Man stellt den Kolben zwecks Stabilisierung der Färbung für 15 bis 30 Minuten auf ein siedendes Wasserbad, läßt abkühlen, füllt in einem Meßkolben auf 100 ml auf und photometriert.

auch in Pflanzenextrakten, Bodenauszügen oder auch in den Reagenzien, wie z. B. im Natriumacetat des Puffers, vorkommen kann.

Es ist bekannt, daß auch die Kieselsäure von niedrigem Molekulargewicht (die sogenannte „lösliche Kieselsäure") imstande ist, in einem Medium geeigneter Acidität die Hetero-poly-silico-molybdänsäure zu bilden, die dann unter ähnlichen Bedingungen wie die betreffende Phosphorverbindung zu Silicomolybdänblau reduziert wird.

An anderer Stelle[5] hat der Verfasser das Verfahren zur Bestimmung der löslichen Kieselsäure beschrieben. Es ist vor allem notwendig, die quantitative Bildung des Silicomolybdänkomplexes zu gewährleisten. Diese Reaktion läuft aber nicht so schnell ab wie die der Phosphorsäure, sondern sie braucht bei optimaler Acidität (p_H = 1,5 bis 1,8) einige Minuten*, um quantitativ abzulaufen[6].

Besondere Versuche[6] haben gezeigt, daß auch die Silicomolybdänsäure in zwei Formen, einer gelben und einer farblosen, vorkommt; diese Formen befinden sich in einem Gleichgewicht, das aber weder durch die Temperatur noch durch die Acidität merklich beeinflußt wird, im Gegensatz zum Verhalten der entsprechenden Verbindungen des Phosphors. Ein anderer grundlegender Unterschied zwischen den beiden Heteropolysäuren, der zu analytischen Zwecken ausgenutzt werden kann, ist das Verhalten gegenüber Säuren. Während die Phosphormolybdänsäure gegenüber Säuren sehr wenig beständig ist (17 ml 8-n Schwefelsäure zerstören augenblicklich die Verbindung), ist dagegen die Beständigkeit der Silicomolybdänsäure ganz bedeutend, wenn sich die Verbindung einmal in einem Medium schwacher Acidität gebildet hat. Die 17 ml der 8-n Schwefelsäure üben auf sie keine zersetzende Wirkung aus.

Wenn man in schwach saurem Medium arbeitet (p_H zwischen 4 und 5), wie dies für die Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure in Gegenwart von Estern vorgeschrieben ist, kann sich bei Gegenwart von löslicher Kieselsäure auch ein wenig Silicomolybdänsäure bilden, die dann zum Silicomolybdänblau reduziert wird. Um diese Störung auszuschalten,

* Es konnte klargestellt werden[6], daß die Bildung der Silicomolybdänsäure nur in Gegenwart kleiner Mengen von Schwefelsäure möglich ist: nur unter dieser Bedingung ist die Molybdänsäure frei. Wenn beträchtliche Mengen von Schwefelsäure vorhanden sind, liegt in der Lösung nicht freie Molybdänsäure, sondern Molybdänschwefelsäure vor, die nicht im Stande ist, mit Si(IV) zu reagieren. Mit anderen Worten: die Schwefelsäure entzieht der Kieselsäure das MoO_3 in dem Maße, daß die Bildung des Komplexes verhindert wird. Andere Säuren (Oxalsäure, Zitronensäure usw.) haben eine noch größere Gegenwirkung, da die betreffenden Komplexsäuren (Molybdänoxalsäure, Molybdänzitronensäure) ganz bedeutend stabiler sind als die Molybdänschwefelsäure. Wie bekannt, wurde diese Tatsache bereits zur Bestimmung der Phosphorsäure in Gegenwart löslicher Kieselsäure benützt.

kann man die verschiedene Beständigkeit der beiden Heteropolysäuren gegenüber Schwefelsäure benutzen[7].

Wenn sich einmal — in der Kälte und in den ersten Minuten — das Phosphormolybdänblau (noch nicht „stabilisiert") gebildet hat und wenn zu befürchten ist, daß sich auch Silicomolybdänblau gebildet haben könnte, bestimmt man in einem Teil nach vorherigem Ansäuern mit 17 ml 8-n Schwefelsäure in der Wärme die stabilisierte Farbe durch eine photometrische Messung und erhält die Summe $P_2O_5 + SiO_2$. In einem zweiten Teil der Lösung, der mit der gleichen Menge 8-n H_2SO_4 angesäuert wurde, werden das Phosphormolybdänblau und das Silicomolybdänblau mit Permanganat oxydiert und so die Heteropolysäuren zurückgebildet. Die Phosphormolybdänsäure wird dabei zerstört, die Silicomolybdänsäure bleibt bestehen. Setzt man sofort neuerdings das Reduktionsmittel zu und erwärmt, so erzielt man die Bildung und Stabilisierung nur des Silicomolybdänblaus in derselben Menge wie in der Summenbestimmung. Die Differenz der beiden Werte stellt die Menge der vorhandenen anorganischen Phosphorsäure dar.

Damit ist die Möglichkeit gegeben, nicht nur kleinste Mengen Phosphorsäure in Gegenwart von Phosphorsäureestern zu bestimmen, sondern auch in Gegenwart löslicher Kieselsäure, auch wenn diese in sehr großem Überschuß vorhanden ist*.

Das bei geringer Acidität ($p_H = 4$ bis 5) erhaltene Molybdänblau (siehe die Bestimmung des anorganischen Phosphors in Gegenwart von Phosphorsäureestern) hat die besondere Eigenschaft[8], praktisch nicht von Filtrierpapier adsorbiert zu werden. Daher kann man die Molybdänblaulösung durch gutes phosphorsäurefreies Filtrierpapier filtrieren und so optisch leere Lösungen der Kolorimetrierung zuführen. Nach der Filtration wird mit der vorgeschriebenen Menge Schwefelsäure angesäuert und zur „Stabilisierung" der Farbe erwärmt.

Ist dagegen die Lösung stark sauer ($p_H < 1$), so wird das Phosphormolybdänblau sehr stark vom Filterpapier adsorbiert. Das Silicomolybdänblau zeigt analoges Verhalten.

Es konnte auch festgestellt werden[8], daß weder das Phosphor- noch das Silicomolybdänblau bei geringer Acidität ($p_H = 4$ bis 5) von Bodenproben adsorbiert werden, während dies bei p_H-Werten unter 1 in beachtlichem Maße der Fall ist.

---

* Die in diesem Falle zu befolgende Arbeitsvorschrift wird im Teil II angegeben, wo die Arbeitstechnik, die sich auf die neuen Erkenntnisse über die Molybdänblau-Kolorimetrie stützt, auf einen praktischen Fall angewendet wird, dem in der Agrarchemie eine besondere Bedeutung zukommt, nämlich für die Bestimmung der leichter löslichen Bodenphosphate.

II. Die Bestimmung der leichtest löslichen Bodenphosphate

Die im vorstehenden wiedergegebenen Erkenntnisse führten zu einem neuen und originellen Verfahren[9] zur Bestimmung der leichtest löslichen Bodenphosphate. Dieses unterscheidet sich von zahlreichen anderen Methoden zur Bestimmung der „assimilierbaren" Phosphorsäure durch die Tatsache, daß die Bildung des Phosphormolybdänblaus — auf der ja die Bestimmung von Spuren von P_2O_5 beruht — nicht in einem Bodenextrakt, sondern in Gegenwart der Bodenprobe selbst vorgenommen wird. Dies geschieht in der Absicht zu verhüten, daß sich Gleichgewichte zwischen den in Lösung befindlichen Phosphationen und den Phosphaten des Bodenkörpers, in welcher Form immer sie vorliegen mögen, ausbilden.

Das Verfahren gestattet, in einer einzigen Operation den gesamten in einer bestimmten Zeit unter gewählten Bedingungen in Lösung gehenden Phosphor zu bestimmen.

Die Ausbildung von Gleichgewichten zwischen den Phosphationen in Lösung und den durch Adsorption und Wiederausfällung im Bodenkörper zurückgehaltenen Phosphaten stellt gerade den Gegensatz zu dem physiologischen Verhältnis zwischen Pflanze und Boden dar. Diese Ausbildung von Gleichgewichten ist die Ursache bedeutender Unsicherheiten bei der Analyse und sie beschränkt zugleich die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, wie sie durch alle jene Methoden erhalten werden, die eben diese Gleichgewichte hervorrufen, indem sie die Bestimmung des Phosphors in einem von der Probe abgetrennten Auszug vorschreiben.

Wir sind der Meinung, daß das neue Verfahren imstande ist, diesen Fragenkomplex zu lösen, indem die Phosphormolybdänsäure in Gegenwart der Bodenprobe gebildet wird, und zwar in dem Maße, als die Phosphate nach und nach in Lösung gehen; sie werden sofort und irreversibel Gleichgewichten jeder Art durch die Bildung der betreffenden Heteropolysäure entzogen.

Es scheint uns erlaubt, diese irreversible Entfernung der Phosphationen wenigstens ihrer Wirkung nach mit jener zu vergleichen, die durch die Pflanzenwurzeln hervorgerufen wird[10]. Die auf diesem Wege bestimmte Menge von P_2O_5 sollte jene Menge löslicher Phosphate darstellen, die den Pflanzenwurzeln zur Verfügung steht. Dieser Wert muß sich viel besser der Wirklichkeit anpassen, als es die Resultate der bisher verwendeten Methoden zur Bestimmung der Phosphatfruchtbarkeit der Böden imstande sind. Alle diese Methoden gestatten nur, den Anteil der löslichen Phosphate zu bestimmen, der dem sich zwischen der Lösung und der Bodenprobe ausbildenden Gleichgewichte unter den Versuchsbedingungen entspricht.

Wir sind der Meinung, daß diese neue Methode zur Bestimmung der leichtest löslichen Phosphate besser zu dem Ziele führt, die Phosphatfruchtbarkeit der Böden bewerten zu können, besonders wenn diese

Methode durch Feldversuche die notwendige Eichung erfährt. Es erscheint also nicht abwegig, den durch diese Methode bestimmten, leichtest löslichen Phosphor als „verfügbaren" oder „assimilierbaren" zu bezeichnen und so die bereits in Gebrauch befindliche Terminologie zu benutzen.

Da der Vorgang, auf dem die neue Methode[11] beruht, bei einem pH zwischen 4,0 und 5.0 durchgeführt werden muß, wird die Lösung auf ein pH — 4,8 abgepuffert. Dies ist derselbe Wert, den auch *Morgan* bei seiner Methode anwendet und den auch andere Autoren als den günstigsten bezeichnen.

Es konnte jedoch festgestellt werden, daß zwar die einfache Pufferung am Anfang genügt, um auch geringe pH-Änderungen des Materials bei Verwendung von sauren und schwach sauren Böden zu verhindern, wenn die andernorts[12] beschriebenen Versuchsbedingungen eingehalten werden. Diese Pufferung genügt aber nicht, um die Reaktion bei einem bestimmten pH (4,8) ablaufen zu lassen, wenn man es mit deutlich sauren Böden zu tun hat oder aber mit solchen, die „aktiven" Kalkstein auch in bescheidenen Mengen enthalten. Um nicht die Löslichkeit der im Boden enthaltenen Phosphate zu beeinflussen, muß das pH während der ganzen Reaktionszeit konstant gehalten werden. Wenn die Methode für jede Bodenart geeignet sein soll, müssen die Reaktionsbedingungen unter allen Umständen streng konstant gehalten werden. Andererseits scheint es logisch, eine solche Konstanz des pH — abgesehen von seinem Absolutwert — auch unter natürlichen Bedingungen anzunehmen, besonders wenn der Boden mit einem ausgesprochenen Pufferungsvermögen ausgestattet ist.

Um die pH-Konstanz zu gewährleisten, werden der acetathältigen Lösung je nach Bedarf Eisessig oder gesättigte Na-Acetatlösung zugesetzt. Die Verwendung von Mineralsäuren ist ausgeschlossen, weil diese unvermeidlich zu plötzlichem, wenn auch kurzem Absinken des pH-Wertes der Lösung und damit zu einer Veränderung der Löslichkeit der Bodenphosphate führen würden. Das Verhältnis Bodenprobe : Lösung wurde mit 1 : 50 als günstig befunden[9]. Die Temperatur wurde auf 22° C konstant gehalten und ein sicherer Kontakt zwischen Bodenprobe und Reagenslösung mittels eines durch die Suspension perlenden Gasstromes hergestellt. Um die Methode zu Serienanalysen verwenden zu können, ist es ausreichend, von jeder Probe nur eine Analyse auszuführen, die nur eine halbe Stunde dauert, und nur in Sonderfällen die in verschiedenen Zeiten sich lösenden Phosphatmengen zu bestimmen, wie dies zur Bestimmung der Lösungsgeschwindigkeit der Phosphate vorgeschlagen worden war[9].

Die neue Methode eignet sich, um nicht nur den in Lösung gehenden „mineralischen" Phosphor (als Phosphation), der unmittelbar von der Pflanze ausgenutzt werden kann, leicht zu bestimmen, sondern auch

um die Menge des in „organischer" Form vorliegenden Phosphors festzulegen. Dieser wird aus der Differenz zwischen dem „gesamten in Lösung gegangenen" Phosphor, nach Zerstörung der organischen Komponente, und dem „mineralischen" Phosphor berechnet.

Die genaue Kenntnis der vorhandenen Menge an „organischem" Phosphor hat ohne Zweifel eine große Bedeutung für die Beurteilung der Phosphatfruchtbarkeit der Böden. Nach unserer Meinung muß der lösliche organische Phosphor als für die Pflanzen praktisch verfügbar betrachtet werden. Es ist anzunehmen, daß die Phosphorsäureester in kurzer Zeit hydrolysieren. Die weniger beständigen können während der Reaktionsdauer verseift werden, auch weil das Molybdat die Hydrolyse der organischen Phosphate katalysiert[13].

Andererseits muß hervorgehoben werden, daß die Bestimmung des „gesamten in Lösung gegangenen" Phosphors zusammen mit der Bestimmung des „mineralischen" Phosphors, wenn in allen Proben ausgeführt, eine besonders bei Serienanalysen sehr nützliche Kontrolle darstellt, die sonst fehlen würde.

Wir weisen nochmals ganz besonders auf die Reproduzierbarkeit der mit der neuen Methode erhaltenen Resultate hin, wie sie leicht erhalten werden kann, wenn alle Versuchsbedingungen konstant gehalten werden. Diese sind: das Verhältnis Bodenprobe : Reagenslösung, Dauer der Reaktion, pH, Temperatur usw. Diese für die Praxis so wichtige Reproduzierbarkeit fehlt vielen der bisher veröffentlichten Methoden und ganz besonders jenen, die sehr milde Extraktionsmittel anwenden[14].

Die Methode wurde in der beschriebenen Form bereits einer praktischen Prüfung von beachtenswertem Ausmaß unterzogen. Sie wurde seit zwei Jahren mit zufriedenstellendem Ergebnis zur Bestimmung des löslichen Phosphors in vielen Tausenden von Bodenproben aus allen Zuckerrübengebieten Italiens herangezogen[15], wobei 60 bis 70 Bestimmungen pro Tag ausgeführt wurden. Die beschriebene Methode ist heute in Italien diejenige, die zur Beurteilung der Phosphatfruchtbarkeit der Böden am meisten angewandt wird.

Beschreibung der Methode

Es werden die folgenden Reagenzien benötigt, die für Phosphor und Arsen eine vollkommen negative Blindprobe aufweisen müssen, während eine ganz schwach positive Reaktion für Silicium zugelassen ist.

1. *0,4-m Natriumacetat/Essigsäurepuffer vom* pH = *4,8:* 240 ml 1-m Natriumacetat + 160 ml 1-m Essigsäure werden mit Wasser auf 1 l verdünnt;

2. *Ammoniummolybdatlösung, 1,44%ig*: 1 ml dieser Lösung soll soviel Ammoniummolybdat enthalten, als 12 mg Molybdänsäureanhydrid entspricht[2];

3. *8-n Schwefelsäurelösung;*
4. *Ascorbinsäurelösung*, 2,5%ig, frisch bereitet;
5. *Kaliumpermanganatlösung*, ungefähr 1-n;
6. *Eisessig;*
7. *Natriumacetatlösung*, gesättigt;
8. *Gooch-Tiegelasbest*, gewaschen und kalziniert.

a) Herstellung der Analysenlösung

Die Reaktion wird in Kelchgläsern an Stelle der beschriebenen[9] Gefäße durchgeführt, was die wiederholte pH-Kontrolle sehr erleichtert. Die Kelche werden in ein Wasserbad eingestellt, dessen Temperatur durch einen Thermostaten auf 22° ± 1°C gehalten wird. Von Zeit zu Zeit wird das pH mit einem Potentiometer gemessen (z. B. dem Potentiometer, Modell G, von Beckman mit Außenelektroden) und, wenn nötig, durch Zusatz von Eisessig oder Natriumacetatlösung auf den pH-Wert 4,8 eingestellt. Hat man Proben von sehr saurem Boden vorliegen, so ist es vorteilhaft, einige Tropfen einer konz. Natronlauge zuzusetzen, um eine übermäßige Verdünnung zu vermeiden.

Man geht wie folgt vor: man stellt das Bad auf 22° ein und gießt in einen Meßzylinder 50 ml der Pufferlösung, 20 ml der Ammonium-Molybdat-Lösung und füllt mit Wasser auf 91 ml auf. Diese Lösung wird in ein Kelchglas der hohen Form von 250 ml Inhalt gegossen und das Glas in das Wasserbad gestellt. Man taucht nun ein Glasrohr, dessen Ende auf eine Öffnung von 1 bis 1,5 mm ausgezogen ist, so in den Kelch, daß die Spitze 2 bis 3 mm vom Boden entfernt ist. Aus einer Kohlensäurebombe läßt man nun einen lebhaften Gasstrom durch die Flüssigkeit streichen und setzt 2 g der feinen Bodenprobe zu. Man stellt auf pH = 4,8 ein, indem man in kurzen Abständen je nachdem einige Tropfen Eisessig oder gesättigte Natriumacetatlösung zusetzt. Genau fünf Minuten nach Zusatz der Bodenprobe werden 8 ml der Ascorbinsäurelösung, die frisch bereitet sein muß, zugesetzt. Das Gesamtvolumen beträgt jetzt 100 ml (±1), und das Verhältnis Bodenprobe : Reagenslösung ist 1 : 50.

Das pH muß von Zeit zu Zeit kontrolliert und, wenn nötig, durch Zusatz von Eisessig oder konz. Natriumacetatlösung für die ganze Dauer der Reaktion konstant gehalten werden. Die gesamte Reaktionszeit beträgt vom Zeitpunkt des Zusatzes der Ascorbinsäurelösung 35 Minuten, da der irreversible Entzug der Phosphationen beginnt, sobald die Bodenprobe mit der Reagenslösung zusammengebracht wird.

Die durchgeleitete Kohlensäure gewährleistet einen guten Kontakt zwischen Bodenprobe und Reagenslösung, die durch den Gasstrom in dauernder lebhafter Bewegung gehalten wird. Überdies schützt die Kohlensäure die Ascorbinsäure vor dem Sauerstoff der Luft, gegen den sie bei pH = 4,8 sehr empfindlich wäre.

Nach 30 Minuten saugt man durch einen Büchnertrichter von 10 cm Durchmesser unter Verwendung eines Filters (Schleicher und Schüll, Nr. 589², Weißband) ab. Auf dieses Filterpapier wird vor der Verwendung eine dünne Schicht Gooch-Tiegelasbest festgesaugt. Bequemer ist die Verwendung einer Glasfrittennutsche (Jena G1), deren Sinterplatte ebenfalls vor der Verwendung mit einer dünnen Asbestschichte (1 bis 2 g) versehen wird. Die Filtration muß in 1 bis 2 Minuten vollendet sein. Sollte sie länger dauern, so ist es zweckmäßig, die ganze Bestimmung zu wiederholen und nach dem Zusatz der Ascorbinsäure ungefähr 1 g Asbest zur Bodensuspension hinzuzufügen. Das Filtrat selbst muß vollständig klar sein.

b) Die Technik der verschiedenen Bestimmungen

1. Die Bestimmung des „mineralischen Phosphors"

Im Filtrat werden gesondert die Summe $P_2O_5 + SiO_2$ und SiO_2 allein bestimmt. Letzteres muß von der Summe abgezogen werden, um den Gehalt an mineralischer Phosphorsäure zu erhalten.

Vom klaren Filtrat werden zweimal je 25 ml in zwei 250-ml-Erlenmeyerkolben pipettiert und 50 ml Wasser zugesetzt. Man läßt genau 5 Minuten nach der Filtration stehen, um demjenigen Anteil der Phosphormolybdänsäure, der sich in den letzten Augenblicken des Kontaktes zwischen Bodenprobe und Reagenslösung gebildet hat, die vollständige Reduktion zu ermöglichen[2]. Hierauf werden, möglichst gleichzeitig, je 17 ml 8-n Schwefelsäure unter sorgfältigem Schütteln zu beiden Proben hinzugefügt. Durch diese Maßnahme wird die weitere Bildung sowohl von Phosphor- als auch von Silico-Molybdänsäure unterbrochen[4].

Eine Probe dient zur Bestimmung von $P_2O_5 + SiO_2$. Sie wird für 15 bis 30 Minuten auf ein siedendes Wasserbad gesetzt. Die für die Bestimmung des Siliciumdioxyds dienende Probe wird mit Permanganat versetzt, bis eine rotviolette Färbung bestehen bleibt. Hierauf setzt man 2 ml Ascorbinsäurelösung zu und stellt für 15 bis 30 Minuten auf ein siedendes Wasserbad. Nach dem Abkühlen werden beide Proben in einem Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt und die photometrische Messung mit einem geeigneten Instrument vorgenommen. Praktisch hat man nur die Extinktion der beiden Lösungen voneinander abzuziehen, um die Extinktion des Phosphormolybdänblaus allein zu erhalten. Aus diesem Wert ergibt sich[16] die Konzentration der „mineralischen Phosphorsäure" in der Probe. Es ist vorteilhaft, das Ergebnis in Teilen pro Million, d. h. in mg P_2O_5/kg Boden, auszudrücken.

2. Bestimmung des „gesamten in Lösung gegangenen Phosphors"

25 ml des unter a) erhaltenen klaren Filtrates werden in einen 100-ml-Kjeldahlkolben gebracht. Man setzt 6 ml 8-n Schwefelsäure, 0,1 bis 0,2 g

Kaliumperchlorat und einige Glaskugeln zur Vermeidung des Siedeverzuges hinzu. Wenn die Bodenprobe reich an organischer Substanz ist, ist die Menge des Perchlorates zu erhöhen. Man läßt über freier Flamme kochen bis zur Bildung weißer Schwefelsäuredämpfe und jedenfalls, bis die Flüssigkeit vollkommen farblos geworden ist, d. h. bis zur Zerstörung der organischen Substanz. Man läßt abkühlen, verdünnt mit 80 bis 85 ml Wasser und setzt 2 ml Ascorbinsäurelösung zu. Man stellt nun den Kolben für 30 Minuten auf das siedende Wasserbad, läßt abkühlen und füllt im Meßkolben auf 100 ml auf. Eine eventuelle Trübung, die von Calciumsulfat herrührt, stört nicht, da sie sich sehr leicht absetzt. Die überstehende klare Flüssigkeit wird wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Aus der Extinktion erhält man den Wert für die Konzentration des „gesamten in Lösung gegangenen Phosphors". Wie schon gesagt, gestatten die Bestimmungen 1 und 2 die Berechnung des vorhandenen „organischen Phosphors". Er ist die Differenz zwischen dem „gesamten in Lösung gegangenen Phosphor" und dem „mineralischen Phosphor".

Die nach dieser Methode erhaltenen Blaufärbungen sind überaus beständig. Sie können auch viele Stunden nach der Herstellung photometriert werden. Dies ist nicht nur ein großer Vorteil bei der Durchführung von Serienanalysen, sondern die Messung kann auch zu Kontrollzwecken nach einem gewissen Zeitraum wiederholt werden.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Untersuchungen des Verfassers über die Natur der Phosphor- und Silicomolybdänsäure und ihre blauen Reduktionsprodukte werden dargelegt. Diese bilden die Grundlage für die Mikrobestimmung des mineralischen Phosphors allein oder in Gegenwart von Phosphorsäureestern und auch von Kieselsäure niedrigen Molekulargewichtes (sogenannte „lösliche Kieselsäure"). Eine neue chemische Methode zur Bestimmung der leichtest löslichen Phosphate in Böden zum Zwecke der Bewertung der Phosphatfruchtbarkeit wird beschrieben. Diese fußt auf der neuerdings vom Verfasser angegebenen Arbeitsvorschrift. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung des Phosphormolybdänblaus nicht in einem Bodenextrakt, sondern in Gegenwart der Bodenprobe selbst vorgenommen wird, und zwar zu dem Zwecke, um die Ausbildung von Gleichgewichten zwischen den in Lösung befindlichen Phosphationen und den in welcher Form immer vom Boden zurückgehaltenen Phosphationen und die von diesen Gleichgewichten herrührenden Nachteile zu vermeiden.

Die beschriebene Methode wurde bereits zur Serienanalyse von einigen Tausenden von Bodenproben herangezogen. Sie ist die gegenwärtig meist-

verwendete Methode zur Bewertung der Phosphatfruchtbarkeit der Böden in Italien.

Summary

The writer's studies of the nature of phospho- and silicomolybdic acids and their blue reduction products are reviewed. These studies form the basis for the determination of mineral phosphorus, either alone or in the presence of esters of phosphoric acid and also of silicic acid of low molecular weight, the so-called "soluble silicic acid". A new method for determining the lighter soluble phosphates in soils for the purpose of appraising the phosphate fertility is described. This is based on the writer's recently published procedure. It is characterized by forming the phosphomolybdate blue not in an extract but rather in the presence of the soil sample itself. The purpose is to prevent the developement of the equilibria between the phosphate ions in the solution and those always retained in same manner in the soil and thus to avoid the disadvantages growing out of these equilibria.

The method described here has been used in series analyses of several thousand soil samples. It is now the most widely used method in Italy for evaluating the phosphate fertility of soils.

Résumé

L'auteur expose les résultats qu'il a obtenus lors de ses recherches sur la nature des acides phosphomolybdique et silicomolybdique et de leurs produits de réduction bleus. Ces résultats servent de base au microdosage du phosphore minéral seul ou en présence d'esters phosphoriques ou encore d'acide silicique de faible masse moléculaire (dénommé «acide silicique soluble»). On décrit une nouvelle méthode chimique de dosage des phosphates, qui se dissolvent facilement dans les sols, afin de déterminer leur pouvoir fertilisant; cette méthode repose sur le mode opératoire récemment publié par l'auteur; elle présente la particularité de permettre la formation du bleu de phosphomolybdène en présence de l'échantillon de sol et non pas dans un extrait; on évite ainsi l'établissement d'équilibres entre les ions phosphoriques présents dans la solution et ceux qui sous une forme quelconque sont toujours retenus par le sol ainsi que les erreurs qui sont ainsi engendrées.

La méthode décrite a déjà été appliquée à quelques milliers d'échantillons de sols qui ont été analysés en série. Elle est actuellement la méthode la plus souvent employée en italie pour la détermination du pouvoir fertilisant des phosphates.

Literatur

[1] *G. Denigès*, Mikrochem., Pregl-Festschrift, 27 (1929).

[2] *C. Ferrari*, Gazz. chim. ital. **81**, 795 (1951).

[3] *C. Ferrari*, Memorie accademia scienze istituto, Bologna [9] **4**, 63 (1936/37).

[4] *C. Ferrari*, Ann. sperimentazione agraria, nuova serie, **7**, 477 (1953).

[5] *C. Ferrari*, Mikrochem. **36/37**, 585 (1951).

[6] *C. Ferrari*, Gazz. chim. ital. **81**, 692 (1951).

[7] *C. Ferrari* e *P. Lugo*, Ann. sperimentazione agraria, nuova serie, **7**, 369 (1953).

[8] *C. Ferrari*, Ann. sperimentazione agraria, nuova serie, **7**, 517 (1953).

[9] *C. Ferrari*, Trans. Joint Meeting Commissions II and IV of the Intern. Soc. of Soil Science, Dublin **2**, 99 (1952).

[10] *H. Burström*, The Mechanism of Ion Absorption, in "Mineral Nutrition of Plants", edited by *Emil Truog*, The University of Wisconsin Press, 1953. p. 251.

[11] *C. Ferrari* e *P. Lugo*, Rend. accad. scienze istituto, Bologna, serie XI, Tomo II, Fascicolo I, 34 (1954—55).

[12] *G. Sandri*, *P. Coraducci* e *P. Lugo*, Trans. Joint Meeting Commissions II and IV of the Intern. Soc. of Soil Science, Dublin 2, 103 (1952).

[13] *H. Weil-Malherbe* e *R. H. Green*, Biochemic. J. 49, 286 (1951).

[14] *R. Herrmann*, Methodenbuch, Band I — Untersuchung von Böden. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungsanstalten. Berlin: J. Neumann. 1941. S. 134.

[15] *O. Spettoli*, L'industria saccarifera Italiana, Anno XLVII, n. 5—6, 175 (1954).

[16] *C. Ferrari*, Analisi microchimiche colorimetriche. Bologna: Cesare Zuffi. 1947.

Queens College, Flushing 67, N.Y.

Bei Präzisionswägungen zu beachtende Vorsichtsmaßregeln

Von

A. A. Benedetti-Pichler

(Eingelangt am 10. Februar 1955)

Das Geschick wollte es, daß der Autor im Jahre 1920 mit der mikrochemischen Waage von *Kuhlmann* bekannt wurde. Dies hatte zur Folge, daß er sich seither immer wieder veranlaßt sah, die Zuverlässigkeit von Wägungen zu studieren. Die Arbeit war nicht ohne Erfolg und es ist schließlich gelungen, alle wichtigeren Umstände zu erkennen, die beachtet werden müssen, wenn eine Gewichtsbestimmung mit höchster Verläßlichkeit ausgeführt werden soll. Der Vorgang ist an anderen Stellen[2, 3] mit allen Einzelheiten beschrieben. Da die Zweckdienlichkeit dieser umständlichen und umfangreichen Beschreibung einer so einfachen Operation, wie das Wägen aber bezweifelt werden könnte, scheint es angezeigt, gewissermaßen als Einleitung, die grundlegenden Gedanken kurz zu besprechen.

Es sei dabei sogleich darauf hingewiesen, daß der Chemiker beinahe immer nur an Gewichtsdifferenzen interessiert ist, wobei der zu wägende Apparat fünfmal bis tausendmal schwerer ist als die gesuchte Gewichtsänderung. Aus Notwendigkeit ist es für den Chemiker selbstverständlich geworden, ein kleines Gewicht aus der Differenz zweier großer Gewichte zu bestimmen. Dieser ständige Verstoß gegen eine Grundregel der Meßkunde ist wegen der außerordentlichen Leistungsfähigkeit der Hebelwaage möglich, doch sind oft Schwankungen in den bestimmten Gewichtsdifferenzen zu beobachten, die dadurch entstehen, daß man bereits an der Grenze der Leistungsfähigkeit der Waage oder, häufiger, des Wägungsverfahrens angelangt ist. Die meisten Mikroanalytiker werden vermutlich ohne weiteres beistimmen. Es sei aber darauf hingewiesen, daß diese Fehlerquelle auch die Resultate von Makrobestimmungen etwas beeinträchtigen kann.

Ein geübter Arbeiter erhält z. B. bei Ausführung von Parallelbestimmungen einmal die Niederschlagsgewichte 0,6745 g, 0,6744 g und 0,6745 g und ein andermal 0,6451 g, 0,6441 g und 0,6445 g. Man nimmt im allgemeinen an, daß die gute Übereinstimmung in der ersten Reihe der Resultate dem Zufall zuzuschreiben ist. Es ist aber nicht einzusehen, warum ein geübter Analytiker bei sorgfältiger Arbeit nicht im Stande sein sollte, bei Parallelbestimmungen eine derartige Präzision zu erreichen. Die größere Streuung der zweiten Reihe ist leicht durch Fehler der verwendeten Gewichte zu erklären.

Im folgenden soll gezeigt werden, daß es immer wieder ein Mangel an *Präzision* ist, der für „Wägefehler" verantwortlich gemacht werden muß, und daß bei richtigem Vorgang die „Genauigkeit" der Einzelwägung (besser ihre Unsicherheit) durch die Präzision des Verfahrens bestimmt ist.

Wahl der Waage

Wenn, wie es in der Mehrzahl der Fälle zutrifft, eine kleine Gewichtsänderung an einem verhältnismäßig schweren Apparat zu bestimmen ist, so kann die kleine Gewichtsdifferenz nur mittels einer Hebelwaage mit zufriedenstellender Präzision gefunden werden. Bei der Auswahl der Hebelwaage sind Tragkraft und Präzision der Anzeige ausschlaggebend. Aus praktischen Gründen empfiehlt es sich nicht, eine Waage zu verwenden, deren Präzision weitaus besser ist, als es die vorliegende Aufgabe erfordert, da die weniger präzise Waage in der Regel weniger Aufmerksamkeit erfordert und schnelleres Arbeiten gestattet. So ist u. a. eine gute Analysenwaage einer mikrochemischen Waage vorzuziehen, wenn eine mittlere Abweichung der Anzeige von $\pm$ 0,02 mg genügt, wie dies für Bestimmungen im Zentigramm-Maßstab häufig der Fall ist.

Die Leistungsfähigkeit einer Waage ist wesentlich durch die Konstruktion des Balkens und der Lager und die Präzision, mit der man die Lage des Balkens ablesen kann, bestimmt. Die Erhaltung der dem Balken innewohnenden Leistungsfähigkeit ist die Aufgabe der Arretierung[7]. Hilfsgeräte, wie Dämpfung, Kettengewicht und automatische Gewichtsauflage, haben meist einen ungünstigen Einfluß auf die Präzision, so daß Waagen einfacher Konstruktion für Präzisionsarbeit vorzuziehen sind. Ein Reiter hat keinen nachteiligen Einfluß[8], wenn sein Gewicht das tausendfache der mittleren Schwankung der Instrumentanzeige nicht überschreitet, z. B. 1 mg oder weniger bei einer mikrochemischen Waage ist. Das Reiterlineal soll mit dem Nullstrich nahe der linken Endschneide beginnen und mit Teilstrich 10 nahe der rechten Endschneide enden. Dabei ist es vorteilhaft, wenn an beiden Seiten ein weiterer Teilstrich vorgesehen ist (—1 links und 11 rechts). Zehn (12) Intervalle genügen. Die Reiterverschiebung soll so ausgeführt sein, daß der Reiter mit Sicher-

heit gehandhabt und mit Leichtigkeit in einer Ebene, die vertikal zur Ebene des Balkens ist, auf den Balken aufgelegt werden kann.

Das Komitee für Waagen und Gewichte der Abteilung für analytische Chemie der amerikanischen chemischen Gesellschaft hat vor kurzem[1] die Merkmale definiert, die zur Beschreibung und Bewertung von Waagen dienen können. Es wäre wünschenswert, wenn diese Definitionen allgemeine Annahme fänden, da zur Zeit eine Verwirrung herrscht, die eine einfache Beschreibung der Merkmale einer Waage unmöglich macht.

Empfindlichkeit, sensitivity[1], ist definiert als das Verhältnis von Anzeigeänderung zur Gewichtsänderung. — Es sei hinzugefügt, daß die Empfindlichkeit nicht zur Bewertung der Leistungsfähigkeit einer Waage geeignet ist, da Präzision der Anzeige und Empfindlichkeit nicht in eine einfache Beziehung gebracht worden sind. Es scheint ziemlich sicher, daß bei gegebenem Balken eine übermäßig gesteigerte Empfindlichkeit der Präzision nachteilig ist.

Wert des Teilstriches der Zeigerskala in Gewichtseinheit ist natürlich der Empfindlichkeit reziprok und ist wie diese in der Regel eine Funktion der Belastung.

Belastung ist das Gewicht des zu wägenden Objektes oder, und dies ist das gleiche, das Gewicht der Last auf einer Schale.

Instrumentanzeige, i, sei der beobachtete Ausschlag oder Ruhepunkt des Zeigers multipliziert mit dem Wert des Teilstriches für die herrschende Belastung.

Leeranzeige, i_0, sei die Instrumentanzeige, die mit unbelasteter Waage (mit dem Reiter in der Nullstellung) beobachtet wird.

Präzision der Waage. Diese wird am einfachsten durch die mittlere Schwankung ι_L der Instrumentanzeige i für eine gegebene Belastung L beschrieben. Zur Bestimmung von ι_L wird mit der gewählten Belastung der Ausschlag oder Ruhepunkt wiederholt bestimmt, wobei vor jeder Beobachtung zumindest die Waage völlig arretiert und ausgelöst und der Reiter abgehoben und wieder aufgesetzt wird. Aus den beobachteten Ausschlägen oder Ruhepunkten wird in üblicher Weise die mittlere Schwankung in Teilstrichen der Zeigerskala errechnet. Diese gibt nach Multiplikation mit dem Wert des Teilstriches für die herrschende Belastung die mittlere Schwankung ι_L der Instrumentanzeige.

Über Wert des Teilstriches, Belastung, Instrument- und Leeranzeige wurde noch keine endgültige Entscheidung getroffen. Die Präzision der Waage ist nach Komiteebeschluß der mittlere Fehler einer Wägung in absoluten Einheiten, der wie unten angezeigt aus der mittleren Schwankung der Instrumentanzeige berechnet werden kann. Für die Definitionen von reziproker Empfindlichkeit *(sensibility reciprocal)*, Ab-

lesbarkeit *(readability)* und Milligrammäquivalent der Ablesbarkeit *(milligram equivalent of readability)* sei auf den Bericht verwiesen[1].

Wägungsverfahren

Beim Arbeiten mit Hebelwaagen benutzt man in der Regel eine Kombination von zwei durchaus verschiedenen Wägungsprinzipien. Der Hauptteil des Gewichtes wird durch Massenvergleich (Ausgleich des Gewichtes des Objekts mit dem Gewicht von Normalmassen) bestimmt. Der verbleibende geringe Gewichtsunterschied wird aus der Verlegung der Ruhelage des Balkens erschlossen: Neigungswägung.

Eine *Neigungswägung* wird am einfachsten und verläßlichsten ausgeführt, indem man, wie dies *Fritz Pregl* empfohlen hat, den Ausschlag aus den Umkehrpunkten des schwingenden Zeigers berechnet. Hierzu genügt in der Regel und auch bei höchsten Ansprüchen die Beobachtung von 5 aufeinanderfolgenden Umkehrpunkten, von denen die 3 mittleren in einfacher Kopfrechnung ausgewertet werden. Beobachtung des vorangehenden ersten und des letzten Umkehrpunktes gestatten dem Beobachter, sich von der Regelmäßigkeit der Schwingung zu überzeugen. Bei gedämpften (aperiodischen) Waagen liest man einfach den Ruhepunkt des Zeigers ab. Bezüglich Schätzungsfehler sei auf die Untersuchungen von *Gysel* hingewiesen[9].

Zur Eichung der Zeigerskala bestimmt man den Wert des Teilstriches, indem man das Gewicht auf einer Schale um einen genau bekannten Betrag ändert (in der Praxis versetzt man einfach den Reiter) und die dadurch hervorgerufene Änderung in der Ablesung beobachtet. (Es wird zuweilen vergessen, daß es nicht zulässig ist, diese Eichung auszuführen, wenn sich auf einer Schale ein Objekt befindet, das nicht vollkommen gewichtsbeständig ist.)

Verläßliche und genaue Zahlen für den Wert des Teilstriches für häufig vorkommende Belastungen kann man ziemlich mühelos unter Benutzung einer Kontrollkarte erhalten[1, 2]. Es sei schließlich betont, daß die Anwendung der Neigungswägung nicht nur verläßlichere Resultate gibt, sondern auch schneller ist als vollständiger Massenausgleich bis zur Einstellung der Null-Lage des Zeigers. Dies trifft sogar bei gedämpften Waagen zu, die es gestatten, die Belastung mit einem Kettengewicht zu ändern, ohne die Waage zu arretieren.

Massenvergleich wird fast immer durch Proportionalwägung vorgenommen, da das Hebelarmverhältnis 1,00000 $\pm$ 0,00005 (und besser) vom Erzeuger der Waage garantiert ist und die den Chemiker interessierenden Gewichtsdifferenzen fast niemals mit einer derartigen Genauigkeit bestimmt zu werden brauchen. Es ist dabei natürlich immer vorausgesetzt, daß schwere Apparate immer auf derselben Schale derselben Waage zur

Wägung kommen. Dieser Gedankengang zieht jedoch nicht in Betracht, daß *Gauß*sche Doppelwägung beinahe ohne größeren Arbeitsaufwand wenigstens die doppelte Präzision gibt.

Wenn man bedenkt, daß jede präzise Proportionalwägung für die Nullanzeige $i_0 \pm \iota_0$ der Waage berichtigt werden muß, so ergeben sich die folgenden mittleren Schwankungen:

Proportionalwägung: $\pm \sqrt{\iota_L^2 + \iota_0^2}\ (\approx \pm 1{,}4\,\iota_L)$

Substitutionswägung: $\pm \sqrt{\iota_L^2 + \iota_L^2} = + 1{,}4\,\iota_L$

Doppelwägung: $\pm \iota_L/1{,}4$

Lindner[11] hat den Experimentalbeweis erbracht, daß sich das Armverhältnis bei einer mikrochemischen Waage ganz merklich mit der Belastung ändert. Gleichgültig ob dies durch Deformation der Schneiden oder des Balkens verursacht ist, es besteht die Möglichkeit, daß Aufhebung der Belastung das ursprüngliche Armverhältnis nicht augenblicklich wieder herstellt. Es wird dann möglich, daß das jeweilige Armverhältnis von dem der Wägung vorangehenden Gebrauch der Waage abhängig wird. Damit könnte sich das scheinbare Gewicht eines Apparates von nur 1 g Gewicht bei Proportionalwägungen leicht um mehrere Mikrogramm ändern und diese Gewichtsänderungen würden Gewichtsdifferenzen von einigen Milligramm, die durch wiederholtes Wägen desselben Apparates gefunden werden, sichtlich entstellen.

*Gauß*sche Doppelwägung macht das Gewicht von dem jeweiligen Hebelarmverhältnis unabhängig, wobei es ganz gleichgültig ist, ob dieses durch die Vorbenutzung der Waage oder durch ein Temperaturgefälle im Waagengehäuse zeitweiligen Änderungen unterliegt. Derartige Umstände mögen dazu beigetragen haben, daß *Conrady*[6] durch zweifache Anwendung der *Gauß*schen Doppelwägung mit einer zweckmäßig konstruierten Analysenwaage eine Wägungsgenauigkeit von 1 μg erreichen konnte. In Versuchen von *Loscalzo*[12] errechnet sich aus zwei Reihen von 300 Wägungen, die theoretisch erwartete Halbierung der mittleren Schwankung der Instrumentanzeige durch *Gauß*sche Doppelwägung. Das Verhalten einer mikrochemischen Waage war dabei weitaus mehr erratisch als das einer Analysenwaage, so daß bei der ersteren in Reihen von 25 Wägungen die Präzision durch *Gauß*sche Wägung in einem Fall unverändert blieb und in anderen Reihen 1,4- bis 7,5mal verbessert wurde.

Jedenfalls muß *Gauß*sche Doppelwägung dringend empfohlen werden, wenn Erreichung höchster Präzision wünschenswert erscheint. Anleitungen für deren einfache Ausführung und rechnerische Auswertung werden an anderer Stelle gegeben[2, 3]. Praktische Erprobung wird rasch zur Erkenntnis führen, daß der Gewinn an Präzision den kaum merkbaren Mehraufwand an Arbeit weitaus überwiegt. Beim Wägen von Absorptions-

apparaten ist es allerdings wünschenswert, daß beide Schalen in gleicher Weise mit Apparatehaken so ausgerüstet sind, daß die Übertragung der Apparate von einer Schale zur anderen ohne Schwierigkeit ausgeführt werden kann.

Die Tara

Unter der Annahme, daß die Masse des zu wägenden Objektes konstant ist, muß die ungeeignete Wahl der Tara als jene Fehlerquelle angesehen werden, die die Präzision von Wägungen am schwersten beeinträchtigen kann.

Gewichte. Die Verwendung von Gewichten von ungeeigneter Qualität, besonders wenn sie zum Austarieren von verhältnismäßig schweren Apparaten verwendet werden, ist besonders bedenklich. Dies trifft sogar dann zu, wenn es sich um Gewichte handelt, die gewissen „Anforderungen der Normaleichungskommission genügen".

Das *National Bureau of Standards* der Vereinigten Staaten hat im Jahre 1954 die Zulassungsbedingungen für die Prüfung von Gewichtssätzen verschärft, nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Erzeuger augenscheinlich keine Schwierigkeit fanden, die Gewichte einiger Klassen merklich genauer zu justieren, als von den geltenden Vorschriften gefordert wird. Die neue Verordnung[10] ist von besonderem Interesse, da eine neue Klasse J von Gewichten vorgesehen ist, die für Benutzung mit Mikrowaagen bestimmt ist. Gewichte der Klassen M und J müssen aus einem Stück bestehen; in den anderen Klassen sind Gewichte zugelassen, die aus zwei Teilen (Körper und eingeschraubter Griff) zusammengesetzt sind.

Wenn man die mittlere Abweichung vom Nominalgewicht einem Drittel der zulässigen Höchstabweichung gleichsetzt, so findet man die folgenden mittleren Fehler bei Verwendung von Gewichtssätzen, die den Anforderungen des *National Bureau of Standards* entsprechen. Dabei ist angenommen, daß die Korrekturen zum wahren Gewicht nicht bekannt sind oder nicht angewendet werden.

A. Die Tara besteht aus einem Dekagrammstück, drei Grammstücken, einem Dezigrammstück und drei Zentigrammstücken.

Gewichtsklasse:	Geschätzte mittlere Schwankung:
Frühere Klassen M und S	± 0,1 mg
Frühere Klasse S-2	± 0,45 mg
Neue Klasse M	± 0,05 mg
Neue Klasse S	± 0,04 mg
Neue Klasse S-1	± 0,17 mg

Daraus folgt, daß die Verwendung von derartigen Gewichten selbst die Präzision von Makrobestimmungen beeinträchtigen wird, wenn höchste

Anforderungen (Präzision von $\pm$ 0,02 mg, die mit guten Analysenwaagen erreichbar ist) gestellt werden. Selbst eine Präzision von $\pm$ 0,1 mg kann mit Gewichten der Klassen S-2 und S-1 nicht erreicht werden. Diese letzten zwei Klassen werden allgemein im Unterricht in quantitativer Analyse verwendet und der Autor konnte feststellen, daß Studenten in Wägeübungen mit gut erhaltenen, z. T. neuen Gewichtssätzen der Klasse S-2 mit einem mittleren Fehler von $\pm$ 0,3 mg rechnen müssen. In Einzelfällen von mehreren hundert Wägungen wurden Fehler von 0,9 bis 1,2 mg beobachtet, wie dies bei einer derartigen mittleren Schwankung auch zu erwarten ist.

B. Die Tara besteht außer dem Reiter nur aus zwei Gewichten der Zentigrammdekade.

Gewichtsklasse:	Geschätzte mittlere Schwankung:
Frühere Klassen M und S	$\pm$ 12 μg
Frühere Klasse S-2	$\pm$ 60 μg
Neue Klasse J	$\pm$ 1,5 μg
Neue Klasse M	2,5 μg
Neue Klasse S	6 μg
Neue Klasse S-1	15 μg

Bei Beschränkung auf die Verwendung einer Dekade ist nur die Klasse S-2 für Semimikroarbeit nicht geeignet, aber selbst Gewichte der Klassen J und M können ohne Anbringung von Korrekturen in Mikrobestimmungen nicht verwendet werden, wenn man auf eine Präzision von $\pm$ 1 μg bestehen muß.

Die Schwierigkeit kann durch Eichung der Gewichte und Anbringung der gefundenen Korrekturen zum wahren Gewicht überwunden werden. Wenn die Eichung in geeigneter Weise ausgeführt wird, ergeben sich die Korrekturen c mit einer mittleren Schwankung

$$\gamma = \pm 0{,}3\, \iota,$$

wobei $i \pm \iota$ die Instrumentanzeige der Waage ist, mit der die Wägungen und die Eichung vorgenommen werden.

Der bei Wägung mit n Gewichten zu erwartende mittlere Fehler wird dann gleich $\pm$ 0,3 ι $\sqrt{n}$. Soll diese Schwankung die Hälfte der dem Wägungsverfahren eigenen Schwankung nicht überschreiten, so folgt:

Proportionalwägung:	*Gauß*sche Doppelwägung:
$0{,}3\, \iota \sqrt{n} \leqq 0{,}5 \cdot 1{,}4\, \iota$	$0{,}3\, \iota \sqrt{n} \leqq 0{,}5 \cdot \iota / 1{,}4$
und $n \leqq 5{,}6$	$n \leqq 1{,}4$

Da man bei einem geeignet unterteilten Gewichtssatz im Durchschnitt 1,5 Gewichte per Dekade benötigt, ergibt sich, daß man bei

Proportionalwägung 3 bis 4 Dekaden von Gewichten verwenden kann, aber sicherlich nicht mehr als eine Dekade bei *Gauß*schen Doppelwägungen, wenn durch Anbringung der Korrekturen zum wahren Gewicht die dem Wägungsverfahren innewohnende Präzision erhalten werden soll.

Bei mikrochemischer Arbeit wird häufig der Reiter als richtig angenommen und die Gewichte auf den Reiter bezogen. Falls dies aber nicht getan wird, versteht es sich, daß auch die Reiterstellungen entsprechend dem durch Eichung gefundenen wirksamen Gewicht des Reiters korrigiert werden müssen.

Auftriebsschwankungen. Verhältnismäßig schwere Apparate müssen zur Erreichung höchster Präzision der zu bestimmenden Gewichtsdifferenzen mit Taren von annähernd gleichem Volumen (und vorteilhaft von in Natur und Ausmaß gleicher Oberfläche) ausgeglichen werden. Die Dichte und damit das Gewicht der verdrängten Luft hängt von Druck, Temperatur und Feuchtigkeitsgehalt im Waagengehäuse ab. Selbst wenn Temperatur und Feuchtigkeit im Waagenzimmer durch eine Klimaanlage konstant gehalten werden, folgt der Druck den unberechenbaren, erratischen Barometerschwankungen der freien Atmosphäre. Die mittlere Druckschwankung in einem bestimmten Zeitintervall hängt von der geographischen Lage (am größten in den Tropen und am geringsten in hohen Breiten) und der Jahreszeit ab und kann auch für einen gegebenen Ort nur ungefähr geschätzt werden. Aus den veröffentlichten Tabellen der Bundesstaatlichen Wetterstation[13] errechnet sich für die Stadt New York eine mittlere Schwankung von $\pm$ 2 mm für ein Zeitintervall von 6 Stunden und von $\pm$ 5 mm Quecksilber für ein Zeitintervall von 24 Stunden. Da das Wetter in New York häufigem, einschneidendem und schnellem Wechsel unterliegt, sind diese Zahlen für mittlere Breiten reichlich groß und eine frühere Schätzung des Verfassers[4] ist weitaus zu hoch bemessen.

Trotz alledem ergibt sich eine mittlere Gewichtsschwankung von

$$\pm k\,(V - v)\ \mu g,$$

wenn $V - v$ der in Milliliter ausgedrückte Volumunterschied zwischen Objekt und Tara ist. Die Konstante k hängt von den Bedingungen im Waagenzimmer und vom Zeitablauf zwischen den Wägungen ab:

Wägungen in Abständen von	6 Stunden:	24 Stunden:
Klimaanlage im Gebrauch:	$k = 3$	5
Keine Klimaanlage:	8	10

Es folgt, daß ein Volumunterschied von 1 ml je nach den Verhältnissen eine mittlere Gewichtsschwankung von 3 bis 10 μg zur Folge haben kann. Dies ist für Halbmikroarbeit noch zulässig. Wenn aber Gewichtsunterschiede mit einem mittleren Fehler von $\pm$ 1 μg gefunden werden sollen, so muß der Auftriebsfehler auf $\pm$ 0,5 μg und der Volumenunter-

schied zwischen Apparat und Tara auf 0,17 ml bis 0,05 ml reduziert werden.

Eichung der Gewichte

Gewichtssätze mit der Unterteilung 1-2-3-5 in den Dekaden sind empfohlen. Der Verfasser ist der Ansicht, daß sich die Mühe nicht lohnt, einen Satz zu eichen, der zwei oder mehrere Stücke von gleichem Wert enthält, da bei Anbringung der Korrekturen zu oft ein Zweifel entsteht, welches Stück tatsächlich auf der Waagschale war. Auch bei der Eichung ist es wünschenswert, daß alle in Verwendung kommenden Gewichte (einschließlich Hilfs- und Bezugsgewichte) auffallend verschieden sind.

Die Eichung der Gewichte muß derart vorgenommen werden, daß die Korrekturen zum wahren Gewicht eine hohe Präzision ($\pm$ 0,3 ι) erhalten. Da eine Wiederholung der Eichung in angemessenen Zeitabständen erforderlich ist, wird die Ausführung dieser Arbeit durch ein Normaleichamt zuweilen als unbequem empfunden und man mag vorziehen, sie selbst durchzuführen. Dies ist, besonders wenn es sich nur um die Eichung von 1 oder 2 Dekaden handelt (was für chemische Arbeit meist ausreicht), ohne großen Zeit- und Arbeitsaufwand möglich.

Vergleich mit einem geeichten Satz. Der Stück-für-Stück-Vergleich mit den Gewichten eines geeichten Satzes ist ungeeignet, da er selbst bei *Gauß*scher Doppelwägung nicht die gewünschte Präzision der Korrekturen liefert (Mittel aus zwei Doppelwägungen, $\pm$ 0,5 ι), es sei denn, daß man die Mittel aus je 6 *Gauß*schen Wägungen (12 Proportionalwägungen) benutzt. Es ist selbstverständlich, daß auch der Stück-für-Stück-Vergleich wenigstens zweimal ausgeführt werden muß, womöglich durch zwei verschiedene Personen, um sich gegen Irrtümer zu sichern. Vor allem muß man überdies sicher sein, daß sich der geeichte Satz seit der Eichung nicht geändert hat. Sind die Gewichte der beiden Sätze nicht auffallend verschieden in ihrer Erscheinung, so läuft man außerdem Gefahr, daß Gewichte der beiden Sätze vertauscht werden können.

Verfahren von Richards. Das Verfahren von *Th. W. Richards* ist für die Eichung von 1 oder 2 Dekaden praktisch geeignet, wenn man die an anderer Stelle[5] aufgezählten Vorsichtsmaßregeln beachtet, wobei besonders wichtig ist, daß man a) die Wägungen und (besonders) die Berechnungen von einer zweiten Person unabhängig wiederholen läßt, b) schließlich das jeweilige Mittel der gefundenen Korrekturen benutzt und c) Sorge trägt, daß Hilfs- und Bezugsgewichte sich auffallend von den Gewichten des Satzes unterscheiden.

Im Handbuch der Mikrochemie[3] wird überdies gezeigt, wie sich die Berechnung der Korrekturen vereinfachen läßt und wie sich beim Wägen unterlaufende Irrtümer ausmerzen lassen, bevor man zur Berechnung der Korrekturen schreitet.

Metronomisches Verfahren. In der Meßkunde zieht man vor, jede Dekade für sich zu eichen, wobei man sie gleichzeitig an die nächst höhere und nächst niedere Dekade anschließt. Enthält die Dekade 4 Gewichte, so führt man mit diesen wenigstens 8 Gewichtsvergleiche (durch *Gauß*sche Doppelwägung) aus, z. B.:

$$
\begin{aligned}
10 &= 5 + 3 + 2 + d_1\\
10 &= 5 + 3 + 1 + s + d_2\\
10 + s &= 5 + 3 + 2 + 1 + d_3\\
5 &= 3 + 2 + d_4\\
5 &= 3 + 1 + s + d_5\\
5 + s &= 3 + 2 + 1 + d_6\\
3 &= 2 + 1 + d_7\\
3 &= 2 + s + d_8\\
2 &= 1 + s \quad \text{usw.}\\
1 &= s \quad \text{wobei } s = 0{,}5 + 0{,}3 + 0{,}2.
\end{aligned}
$$

Gleichzeitige Lösung der Gleichungen und Anwendung des Prinzips der kleinsten Fehlerquadrate gibt die Korrekturen zum wahren scheinbaren Gewicht der einzelnen Stücke. Die Berechnung wird am besten in Tabellenform durchgeführt, wobei es möglich ist, wiederholt durch einfache Proben die Abwesenheit von Irrtümern nachzuweisen. Zweckmäßige Anleitungen für die einfache Ausführung dieser Rechnungen sind in der chemischen Literatur scheinbar nicht zu finden und man wird sich im allgemeinen an Normaleichämter um Rat wenden müssen. Die von der *Mass Section* des *National Bureau of Standards* der Vereinigten Staaten für die Unterteilung 1-2-3-5 ausgearbeiteten Tabellen und Prüfverfahren sind jedoch vom Verfasser beschrieben worden[2].

Zusammenfassung

Zur Erreichung höchster Präzision in der Bestimmung von Gewichtsänderungen mit einer gegebenen Waage beachte man die folgenden Punkte: 1. Das Gewicht des Objektes wird mit geeigneten Taren und Gewichten beinahe ausgeglichen und der verbleibende Gewichtsunterschied durch Neigungswägung bestimmt. 2. *Gauß*sche Doppelwägung halbiert die mittlere Schwankung der für die Nullanzeige korrigierten Proportionalwägung. 3. Geeichte Gewichte werden in zweckmäßig beschränkter Anzahl verwendet und ihre Korrekturen zum wahren Gewicht angewendet. Ihre Korrekturen zum wahren Gewicht werden durch ein geeignetes Eichverfahren bestimmt. 4. Taren werden so gewählt, daß ihr Volumen dem des Objektes nahezu gleich ist. 5. Die Waage wird mit einem Reiter versehen, dessen Gewicht das Tausendfache der mittleren Schwankung der Instrumentanzeige nicht übertrifft. 6. Die Neigungswägung wird am besten so ausgeführt, daß man den Ausschlag des Zeigers

aus den Umkehrpunkten des schwingenden Zeigers berechnet. Dabei benutzt man jene Reiterstellung, die eine Instrumentanzeige gibt, die sechs Zehntel des von einem Teilstrich des Reiterlineals angezeigten Gewichtes nicht überschreitet.

Befolgung der Ratschläge gibt ohne merklichen Mehraufwand an Arbeit die höchste Präzision, die mit einer gegebenen Waage erreicht werden kann.

Summary

The following rules are recommended for the attainment of the highest precision inherent in a given balance. (1) The weight of the object is nearly completely counterbalanced with suitable tares and weights, and the remaining difference of weight is computed from the equilibrium position of the beam. (2) *Gauss*' transposition weighing should be used in preference to direct weighing since this practically halves the standard deviation of the observed weight. (3) Calibrated weights should be used in properly limited number, and the corrections to true weight should be applied. The latter must be determined by a suitable calibration procedure. (4) Tares are selected so that their volume is practically equal to that of the object. (5) The balance shall be provided with a rider, the weight of which does not exceed by more than one thousand times the standard deviation of the instrument indication. (6) The weighing itself is best performed by computing the deflection from the points of reversal of the swinging pointer. A rider position should be used which gives an instrument indication (deflection times the value of the division of the pointer scale) which does not exceed six tenths of the weight indicated by one division of the rider scale.

The recommended procedure gives in a simple and efficient manner the highest precision of which the balance is capable.

Résumé

Pour atteindre avec une balance donnée la précision la plus élevée qu'elle est susceptible de fournir, il est recommandable de respecter les règles suivantes. (1) Le poids de l'objet doit être presque complètement équilibré par des tares et des poids appropriés, la différence qui subsiste étant calculée d'après la position d'équilibre du fléau. (2) La pesée ne doit pas être effectuée directement mais par la méthode de *Gauss* comportant la transposition des masses, ce qui permet de diviser par deux la déviation standard du poids observé. (3) Les masses marquées doivent être utilisées en nombre convenable et limité et chacune d'entre elles doit être corrigée à son poids réel. (4) Les tares doivent être choisies de façon que leur volume soit pratiquement égal à celui de l'objet à peser. (5) La balance doit être pourvue d'un cavalier dont la masse ne doit pas dépasser celle qui correspond à mille fois la déviation standard des indications de l'instrument. (6) La pesée proprement dite est effectuée au mieux par calcul de l'inclinaison d'après les positions d'amplitude maximum de l'aiguille oscillante. Le cavalier doit être posé de telle façon que l'indication de l'instrument (valeur d'une division de l'échelle de l'aiguille multipliée par l'inclinaison) ne dépasse six dixièmes du poids indiqué par une division de l'échelle du cavalier. La mise en pratique de ces conseils permet d'atteindre de façon simple et efficace la précision maximum que peut fournir la balance.

Literatur

[1] American Chemical Society, Division of Analytical Chemistry, Committee on Balances and Weights, Analyt. Chemistry **26**, 1190 (1954).

[2] *A. A. Benedetti-Pichler*. Quantitative Analysis, Manuskript.

[3] *A. A. Benedetti-Pichler* in Handbuch der mikrochemischen Methoden. Herausgeg. v. *F. Hecht* und *M. K. Zacherl*. Wien: Springer-Verlag, in Vorbereitung.

[4] *A. A. Benedetti-Pichler*, Mikrochem. **34**, 153 (1949).

[5] *A. A. Benedetti-Pichler*, Mikrochem. **34**, 241 (1949).

[6] *A. E. Conrady*, Proc. Roy. Soc. London **101 A**, 211 (1922).

[7] *A. H. Corwin*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **16**, 258 (1944).

[8] *W. Felgenträger*, Feine Waagen, Wägungen und Gewichte, 2. Aufl. Berlin: J. Springer. 1932.

[9] *H. Gysel*, Mikrochim. Acta [Wien] **1953**, 266.

[10] *T. W. Lashof* und *L. B. Macurdy*, National Bureau of Standards Circular 547, Section 1 (Aug. 20, 1954).

[11] *J. Lindner*, Mikrochem. **34**, 67 (1949).

[12] *Anne G. Loscalzo* und *A. A. Benedetti-Pichler*, Mikrochem. **40**, 232 (1953).

[13] United States Department of Commerce, Weather Bureau, 17 Battery Place, New York, N. Y., Local Climatological Data.